

**Synthese und Charakterisierung einfach und mehrfach intern-
markierter DNA-Sonden zur erzwungenen Interkalation:**

Hybridisierungssonden für biologische Anwendungen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Chemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Chem. Felix Florian Hövelmann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz

2. Prof. Dr. Hans Börner

3. Prof. Dr. Andreas Marx

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2015

Abstract

RNA detection in solution, in fixed and in living cells is of high interest and allows us to understand biological processes, ideally on a molecular level. We developed oligonucleotide hybridization probes based on forced intercalation (FIT). FIT probes contain asymmetric cyanine dyes of the thiazole orange family as nucleobase surrogates as an internal label. The thiazole orange is dark in the unbound, single stranded state, due to rapid depletion of the chromophores excited state by torsional twisting. Upon hybridization with target nucleic acids, the reporter is forced into the base stack, resulting in restriction of intramolecular rotation which is accompanied by a dramatic increase in quantum yield. FIT probes are useful to sense mismatched base pairing adjacent to the reporter molecule resulting in increased rotational freedom and, therefore, lowered fluorescence signaling. The probes have been optimized for highest fluorescence response and maximum brightness upon hybridization with complementary nucleic acids. We discovered that locked nucleic acids (LNA) increase both, the nuclease resistance in living cells and the brightness.

FIT-probes were applied in real-time PCR and RNA localization studies in fixed tissue and in living cells. Together with our collaborator Anne Ephrussi we demonstrated that carefully chosen probe sequences disrupted RNA secondary structure and thereby altered the motility of *oskar* ribonucleotide-particles in living oocytes of *Drosophila melanogaster*. The combined use of fluorogenic base surrogates and a second, terminally attached, independent reporter allowed the rapid intracellular RNA-quantification by means of wash-free fluorescence *in-situ* hybridization. We expanded the color repertoire of FIT probes by screening multiple chromophores and discovered quinoline blue as the most responsive chromophore with up to 195-fold fluorescence enhancement. The combined use of cyan- (thiazole yellow), green- (thiazole orange) and red-emissive (quinoline blue) FIT probes allowed the simultaneous detection of multiple RNAs of interest. The same color channels could be used for the development of artificial repeat tags for FIT-probes that will enable live-cell multiplexing by FIT-probes with transgenic RNAs. Moreover, the single nucleotide specificity of FIT probes proved useful for the detection single base variations which occur e.g. in RNA-editing.

Zusammenfassung

Die Visualisierung von RNA in Lösung, in fixierten sowie in lebenden Zellen ermöglicht die Untersuchung biologischer Prozess, idealerweise auf molekularer Ebene. Wir haben DNA-basierte Hybridisierungssonden zur erzwungenen Interkalation (sogenannte FIT-Sonden) entwickelt. Diese beruhen auf dem Ersatz einer natürlichen Nukleobase durch einen umgebungssensitiven, Farbstoff der Thiazolorange-Familie.

Die einzelsträngigen Sonden zeigen ein geringes Fluoreszenzsignal, da die Rotation um die zentrale Methinbrücke den angeregten Zustand effizient entvölkert. Durch Hybridisierung mit komplementären Zielsequenzen wird der Farbstoff in den Basenstapel gezwungen, wodurch die Rotation eingeschränkt wird und verstärkt Fluoreszenz auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sonden optimiert, um maximale Fluoreszenzanstiege und maximale Helligkeit zu erzielen. Wir konnten zeigen, dass der Einbau von Locked Nucleic Acid (LNA) gleichzeitig die Helligkeit und die Stabilität gegenüber Nukleaseverdau vergrößert. Solche LNA-verstärkten FIT-Sonden konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Anne Ephrussi (EMBL-Heidelberg) wurden solche Sonden erfolgreich in der Lebendzell-Bildgebung von *Oskar* mRNA in Oozyten von *Drosophila Melanogaster* eingesetzt. Durch Auswahl entsprechender Sequenzen ermöglichen die Sonden zusätzlich die Störung der Sekundärstruktur der RNA, sodass Fehllokalisierung und verminderte Ribonukleotidpartikel-Beweglichkeit induziert werden kann.

Die kombinierte Verwendung von Thiazolorange und einem zweiten, terminal angebrachten Cy7-Reporter ermöglichte durch Ratiometrische Messungen die Quantifizierung von Sonden und Ziel RNA durch waschfreien Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung.

Wir konnten die Farbauswahl für FIT-Sonden erweitern und etablierten Chinolinblau als den höchst-responsiven Farbstoff in DNA-FIT-Sonden, welcher bis zu 195-fache Fluoreszenzintensivierung zeigte. Die Verwendung von cyan- (Thiazolgelb), grün- (Thiazolorange) und rot-emittierende (Chinolinblau) FIT-Sonden ermöglichte die simultane Detektion drei verschiedener RNA-Sequenzen. Dieselben Farbkanäle wurden ebenfalls zur Entwicklung von Wiederholungseinheiten für FIT-Sonden verwendet. Durch die Expression transgener RNA und die benachbarter Hybridisierung zahlreicher Sonden sollten die Mehrfarbdetektion in lebenden Zellen mit sehr geringer Nachweisgrenze gelingen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Einzelbasenspezifität der FIT-Sonden die Unterscheidung von Einzelnukleotidvariationen, wie sie beispielsweise bei der RNA-Editierung vorkommen, ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin von September 2010 bis Oktober 2014 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung.....	3
2.1 Grundlagen der Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung	3
2.2 DNA- und RNA-Analoga.....	5
2.3 DNA-Synthese	6
2.4 Fluoreszenz-basierte Methoden zur RNA-Detektion <i>in-situ</i> und <i>in vivo</i>	8
2.4.1 Molecular Beacons.....	10
2.4.1 Thiazolorange-basierte Hybridisierungssonden.....	11
2.4.2 Light-Up-Probes.....	12
2.4.3 Dual-markierte RNA- und DNA-Traffic Lights.....	13
2.4.4 Exciton-Controlled Hybridization Oligonucleotide (ECHO)-Probes	14
2.4.5 PNA-Forced Intercalation (FIT)-Probes	15
2.4.5.1 DNA-FIT-Sonden.....	17
3. Zielstellung.....	19
4. Ergebnisse und Diskussion	22
4.1 Vergleich der Anbindung von TO über Serinol und Carbozyklus	22
4.1.1 Synthese von Ser(TO) und Ser(BO).....	23
4.1.2 Synthese der Carbozyklus-BO-Konjugate	24
4.1.3 Auswahl der Sequenzen und Synthese von DNA-FIT-Sonden.....	25
4.1.4 Charakterisierung der Sonden und Vergleich der Anbindungsmodi	27
4.1.5 DNA und RNA-Detektion von <i>Influenza-H1N1-Neuraminidase</i>	29
4.1.6 DNA-FIT-Sonden in der Echtzeit-PCR.....	30
4.1.7 Vermeidung falsch-positiver Signale durch DNA-FIT-Sonden.....	31
4.1.8 Diskussion	32
4.2 6-Hydroxychinolin als umgebungssensitives Nukleobasensurrogat.....	34
4.2.1 Synthese eines artifiziellen 6HC-Nukleosids	34
4.2.2 NMR-Strukturanalyse des 6HC-modifizierten DNA-Duplex in Lösung.....	36
4.2.3 UV-Vis-Absorption zur Analyse der 6HC-modifizierten DNA	38
4.3 Dual-markierte DNA-FIT-Sonden mit gesteigerter Helligkeit zur vereinfachten RNA-Detektion.....	40
4.3.1 Mehrfach TO-markierte Sonden.....	41
4.3.2 Farbwechsel.....	43
4.3.3 TO-TO-Abstandsuntersuchung.....	44
4.3.4 Dual-markierte TOJO-Sonden mit vergrößerte Helligkeit	47
4.3.5 Waschfreie <i>in-situ</i> Hybridisierung zur Detektion von <i>Oskar</i> -mRNA	52
4.3.6 Diskussion	55

4.4	LNA-verstärkte FIT-Sonden zur Detektion von Ribonukleotidpartikeln in lebenden Zellen	57
4.4.1	Der LNA-Effekt in FIT-Sonden.....	57
4.4.2	Vergleich von DNA und LNA-modifizierten FIT-Sonden	59
4.4.3	Nuklease-resistente FIT-Sonden mit vergrößerter Helligkeit	61
4.4.4	<i>Oskar</i> -mRNP-Detektion in lebenden Oozyten.....	66
4.4.5	FIT-Sonden zur Beeinflussung der Lokalisation von Ribonukleotidpartikeln..	69
4.4.6	Übertrag des LNA-Effekts auf TOJO-markierte Sonden	70
4.4.7	Diskussion	71
4.5	qFIT – Sonden zur RNA-Quantifizierung.....	73
4.5.1	Synthese der qFIT-Sonden	74
4.5.2	Charakterisierung der qFIT-Sonden	76
4.5.3	Lokalisierung und Quantifizierung von <i>Oskar</i> -mRNA.....	79
4.5.4	Diskussion	83
4.6	Synthese und Charakterisierung neuer Fluorophore für DNA-FIT-Sonden.....	85
4.6.1	Auswahl und Darstellung neuer Farbstoffe	85
4.6.2	Post-DNA-synthetische Farbstoffmarkierung.....	87
4.6.3	Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe in FIT-DNA.....	89
4.6.4	Vergleich von TO- und CB-markierten 1-Nt-Abstand Sonden.....	92
4.6.5	Simultane Detektion von vier verschiedenen RNA-Sequenzen	95
4.6.6	Sequenzabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von DNA-FIT-Sonden....	97
4.6.7	Diskussion	100
4.7	RNA-Editierung.....	102
4.7.1	Vorüberlegungen zur Detektion von RNA-Editierung	103
4.1.1	Detektion der C-zu-U-Editierung von <i>Nicotiana tabaccum NADH-Dehydrogenase</i> 104	
4.1.2	Detektion der C-zu-U-Editierung von <i>Rattus glycinergen Rezeptor alpha</i>	106
4.1.3	Diskussion	108
4.8	F-Tag – Wiederholungssequenzen zur Mehrfarbdetektion transgener RNAs mittels FIT-Sonden.....	110
4.8.1	Synthese und Charakterisierung von TO-markierten DNA-F-Tag-Sonden	112
4.8.2	Untersuchungen zur benachbarten Hybridisierung von FIT-Sonden	112
4.8.3	BO-markierte F-Tag-Sonden	113
4.8.4	Nuklease-resistente BO- und TO-Sonden	115
4.8.5	Benachbarte Hybridisierung.....	118
4.8.6	Benachbarte Hybridisierung CB-markierter Sonden	121
4.8.7	Biochemische Klonierung der Wiederholungssequenzen.....	124
4.8.8	Messung von <i>in vitro</i> -transkribierter RNA	127
4.8.9	Generierung stabiler Zelllinien zur Expression des F-Tags	130
4.8.10	Diskussion	132

5. Zusammenfassung und Ausblick.....	134
5.1 Zusammenfassung	134
5.2 Ausblick	140
6. Experimenteller Teil.....	142
6.1 Allgemeines und Messgeräte.....	142
6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1	147
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	151
Vergleich von FIT-Sonde und <i>Molecular Beacon</i>	151
Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.1	152
6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2	154
Präparative HPLC zur Reinigung von 6HC-modifizierter DNA	156
6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3	157
Waschfreie Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (<i>FISH</i>)	158
Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.3	159
6.5 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.4	161
Mikroinjektion und Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Oozyten von <i>Drosophila</i> <i>Melanogaster</i>	161
Analytische Daten der Sonden für Kapitel 4.4	162
6.6 Experimentelle Daten Kapitel 4.5.....	165
Analytische Daten zu Kapitel 4.5	167
6.7 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.6	168
Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.6	173
6.8 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.7	176
Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.7	176
6.9 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.8	177
Enzymatische Reaktionen	177
Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.7	179
7. Abkürzungsverzeichnis.....	181
8. Literaturverzeichnis.....	184
9. Anhang.....	193

1. Einleitung

Im Rahmen des Humangenomprojekts konnte in den Jahren 1990-2003 die Nukleotidabfolge der ca. 3.2 Milliarden Basenpaare der menschlichen DNA sequenziert werden. Dies ermöglichte die Kartierung der 20500 im Menschen vorkommenden Gene sowie deren minimale Sequenzabweichung von ca. 0.1% zwischen verschiedenen Individuen. Um diese Leistung zu erbringen, bedurfte es Forschungsgeldern von knapp 2.7 Milliarden US\$ und eine umfangreiche, internationale Kooperation.^[1-4] Ein darauffolgendes Projekt des *National Institute of Health* (NIH) setzte das Ziel, die Kosten zur Sequenzierung eines menschlichen Genoms auf 1000 US\$ zu reduzieren, wodurch ein großer Schritt in Richtung der personalisierten Medizin erzielt würde.^[5] Im Rahmen des sogenannten 1000 US\$-Genom-Projekts wurden seit dem Jahr 2004 akademische und industrielle Forschungseinrichtungen gefördert, um sogenannte *Next-Generation Sequencing-Technologies* zu fördern, Geräte zur Automation zu entwickeln und den wissenschaftlichen Austausch zu gewährleisten.^[6-8] So konnte beispielsweise die Sequenzierung nach Sanger, welche bereits innerhalb des Humangenomprojekts verwendet wurde, weiterentwickelt werden und ist heute eine günstige Routineanalyse in der biologischen Forschung.^[9-11] Die größten technologischen Fortschritte stellen wahrscheinlich die Sequenzierung mittels Nanoporen und die *bridged-PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) dar. Die Nanoporen-Sequenzierung beruht auf modifizierten Transmembranproteinen aufgebracht auf einer Halbleiterplatte, welche die Sequenzierung der DNA durch unterschiedliche Potentialänderungen in Abhängigkeit der verschiedenen Nukleotide ermöglichen.^[12, 13] Die parallele Detektion zahlreicher DNA-Fragmente ohne vorherige Amplifizierung könnte zukünftig die Zeit zur vollständigen Genomsequenzierung auf wenige Minuten reduzieren. Die sogenannte *bridged-PCR* basiert auf der isothermen DNA-Amplifizierung in einer Flusszelle unter Ausbildung von „DNA-Kolonien“, welche mit Hilfe spaltbarer, fluoreszenter Nukleotide sequenziert. In jüngster Zeit machte besonders diese Entwicklung Schlagzeilen, da laut einer Pressemitteilung des Herstellers *Illumina* (San Diego, USA) das Ziel des 1000 US\$-Genoms erreicht wurde.^[14, 15]

Ebenfalls hielten zahlreiche Innovationen in der Nukleinsäurediagnostik Einzug. So hat sich die PCR in zahlreichen Anwendungsbereichen für die Amplifizierung, Echtzeit-Detektion und Quantifizierung^[16, 17] als ein Standardverfahren etabliert und unterlag Weiterentwicklungen, wie beispielsweise der digitalen PCR, welche die sequenzspezifische Quantifizierung von Nukleinsäuren deutlich vereinfachte.^[18-20]

Über die Identifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren hinaus, ist die Kenntnis der Nukleotidabfolge für diagnostische Anwendungen stark begrenzt, solange der Sequenz keine biologische Funktion zugeordnet werden kann. Solche Zusammenhänge sind bisher nur in vergleichsweise wenigen Fällen vollends geklärt. Ein nützliches Beispiel stellt die Detektion einer Einzelbasenmutation dar, bei welcher der Austausch eines Nukleotids zum Einbau einer falschen Aminosäure und letztlich zum (partiellen) Funktionsverlust des codierten Proteins führen kann. Um diesen Zusammenhang herzustellen, bedarf es über die Sequenzanalyse

hinaus einer Funktionsanalyse in biologischen Systemen. Für zahlreiche Forschungsgebiete stellt somit die Sequenzanalyse der DNA oder RNA lediglich den ersten Schritt zur Aufklärungen der biologischen Funktion dar.

Eine bedeutende Herausforderung der aktuellen Forschung besteht darin, die molekularen Zusammenhänge zwischen Nukleinsäuren, ihrer Prozessierung sowie ihrer Funktion aufzuklären. Besonders jüngste Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der *long non-coding-RNAs*^[21, 22] sowie der *circular RNAs*^[23-25] belegen eindrucksvoll, dass diese Zusammenhänge deutlich weiter reichen als die Codierung von Proteinen. Ebenfalls von zentraler Bedeutung sind die Aufklärung der temporalen Lokalisation von RNA in der Entwicklungsbiologie^[26, 27] und bei viralen Infektionen^[28, 29], sowie die Interaktion von Proteinen und Nukleinsäuren, beispielsweise bei alternativen *Splicing*-Prozessen^[30, 31] oder der RNA-Editierung.^[32, 33] Die Detektion von RNA und Proteinen in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie kann wertvolle Informationen über deren Interaktionen liefern. Die Proteinanalytik ist durch die Entwicklung von fluoreszenten Fusionsproteinen^[34] und zahlreichen Methoden der *in vivo* Proteinmarkierung weit fortgeschritten.^[35-37] Im Gegensatz dazu besteht ein ungebrochen hoher Bedarf an effizienten Methoden, die eine erfolgreiche Detektion endogener Nukleinsäuren in lebenden Zellen ermöglichen.

2. Stand der Forschung

2.1 Grundlagen der Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung

Die große Mehrheit der Methoden zur Detektion von Nukleinsäuren basiert auf der Fluoreszenzspektroskopie. Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht durch Relaxation aus elektronisch angeregten Singulett-Zuständen (S_1 , S_2 , ...) in den Grundzustand (S_0), welche im Jablonski-Schema (Abb. 2.4.1) dargestellt ist.^[38] Dieses Phänomen ist sowohl unter natürlichen Substanzen (z.B. Chinin) als auch unter synthetischen Verbindungen weit verbreitet. Die Relaxation aus Triplett-Zuständen wird hingegen als Phosphoreszenz bezeichnet und tritt weit weniger häufig auf.

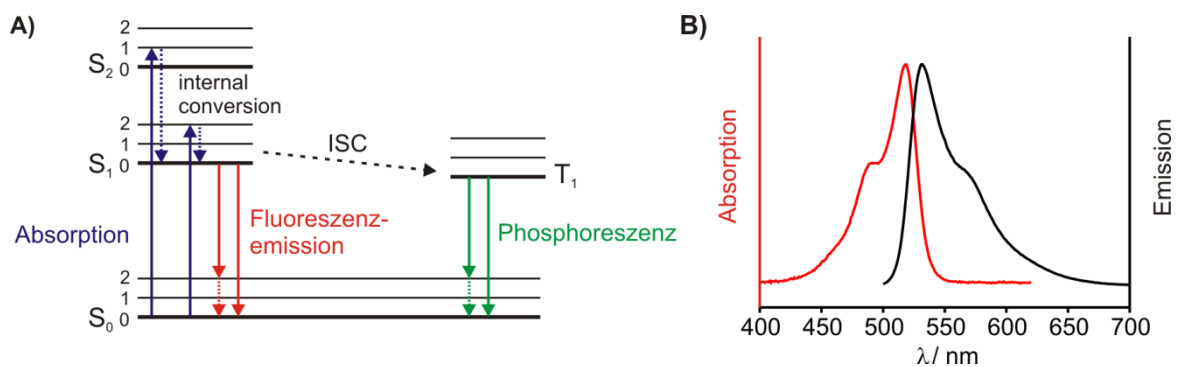


Abbildung 2.1.1: A) Schematische Darstellung des Jablonski-Diagramms und B) Symmetrie der Absorption und Emission am Beispiel des Thiazolorange.

Die Anregung erfolgt durch Absorption von Licht der korrespondierenden Wellenlänge zu einem höheren vibronischen Zustand des S_1 oder S_2 (blaue Pfeile Abb. 2.1.1A). Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt dieser Übergang auf einer Zeitskala von 10^{-15} s, sodass sich dabei der Kernabstand nicht ändert.^[39, 40] Die Relaxation in den niedrigsten vibronischen Zustand des S_1 durch interne Konversion (*internal conversion*, gestrichelte Pfeile) erfolgt typischerweise in weniger als 10^{-12} s und ist somit deutlich schneller als die Fluoreszenzemission mit einer Lebensdauer im Nanosekundenbereich (durchgehende Pfeile in Abb. 2.1.1A).^[41] Daraus ergibt sich, dass die Emission in der Regel aus dem niedrigsten vibronischen Zustand des S_1 erfolgt. Ebenfalls die Rückkehr in den Grundzustand (rote Pfeile) erfolgt in höhere vibronische Zustände, gefolgt von interner Konversion (im Bereich von 10^{-12} s), um das thermische Gleichgewicht wiederzuerlangen. Der Übergang zu unterschiedlichen vibronischen Zuständen bei der Absorption und Emission bedingt die Ausbildung von lokalen Maxima oder Schultern in den Absorptions- und Emissionsspektren, welche am Beispiel von Thiazolorange in Abb. 2.1.1.B dargestellt sind. Die Symmetrie von Absorptions- und Emissionsspektren resultiert aus denselben vibronischen Übergängen bei Anregung bzw. Relaxation sowie den nahezu identischen Energieunterschieden der vibronischen Zustände des S_0 und des S_1 . Die Spinumkehr aus dem angeregten Singulett-Zustand (S_1) in den angeregten Triplett-Zustand (T_1) wird als ISC (*Intersystem Crossing*) bezeichnet. Die Relaxation aus T_1 zu S_0 ist symmetrieverboten, weswegen die Umwandlungsrate des $T_1 \rightarrow S_0$ deutlich geringer ist als jene des $S_1 \rightarrow S_0$.

Die Relaxation erfolgt in den meisten Fällen nicht allein durch Strahlungsemission, sondern ebenfalls durch strahlungslose Entvölkerung des angeregten Zustands, z.B. durch interne Konversion über Translations- oder Rotationsprozesse sowie weitere Löschmechanismen. Als Kenngröße der Effizienz von Chromophoren dient dabei die Quantenausbeute (Φ). Sie gibt das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen wieder und beschreibt somit das Verhältnis der Emission zu konkurrierenden, strahlungslosen Relaxationsprozessen.

Besonders im Hinblick auf responsive Fluoreszenzsonden, welche erst bei Anwesenheit des Analyten ein großes Fluoreszenzsignal erzeugen, spielen Löschprozesse (*Quenching*) eine wichtige Rolle.^[42] Stoßlöschung tritt auf, wenn der angeregte Zustand des Chromophors durch Kollision mit einem anderen Molekül deaktiviert wird (Dexter-Prozess).^[43] Diese dynamischen Prozesse sind unter anderem von der Konzentration des *Quenchers* sowie der Zugänglichkeit des Chromophors abhängig und lassen sich durch die Stern-Volmer-Beziehung beschreiben.^[44] Da die Stoßwahrscheinlichkeit mit der Temperatur zunimmt, ist eine vergrößerte Fluoreszenzlöschung bei steigender Temperatur zu beobachten. Bei statischem *Quenching* handelt es sich hingegen um Grundzustandswechselwirkungen von Fluorophor und *Quencher*, welche bei Anregung wieder in den Grundzustand zurückkehren ohne Photonen zu emittieren. Da mit zunehmender Temperatur der Fluorophor-*Quencher*-Komplex destabilisiert wird, nimmt in diesem Falle die Effizienz des *Quenchings* mit steigender Temperatur ab.

Ebenfalls die Aggregation mehrerer Chromophore kann zu verminderter Fluoreszenz führen.^[45] Bei gleichen Chromophoren können Excimere (*excited state dimers*) gebildet werden, während bei unterschiedlichen Chromophoren Exciplexe (*excited state complexes*) gebildet werden können. Die excitonische Wechselwirkung resultiert aus der Aufspaltung der angeregten Zustände beider Chromophore in ein höheres und ein niedrigeres Energieniveau (*Davydov splitting*), wobei durch die schnelle interne Konversion abermals der niedrigste Zustand des S_1 besetzt wird. Der *Exciton Coupling Effect* begünstigt strahlungslose Übergänge zum S_0 -Zustand, während die wenigen emittierten Photonen, aufgrund der Absenkung des S_1 -Niveaus, eine niedrigere Energie besitzen, sodass eine Rotverschiebung der Exciplex- bzw. Excimerfluoreszenz im Vergleich zum Monomer beobachtet wird.^[46-48]

Ein strahlungsloser Prozess zur Entvölkerung des angeregten Zustands stellt der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dar.^[49, 50] Dieser Prozess tritt auf, wenn das Emissionsspektrum des Chromophors (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines zweiten Chromophors (Akzeptor) überlappt. Der Akzeptor kann, muss jedoch nicht selbst Fluoreszenz zeigen. Bei diesem Prozess ist anzumerken, dass kein Photon übertragen wird, sondern eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Donor im angeregten Zustand und dem Akzeptor im Grundzustand besteht. Die Effizienz des FRET (E) ist unter anderem vom Abstand der beiden Chromophore (r), der spektralen Überlappung (J) sowie der Orientierung der Dipolmomente (κ) abhängig und wird durch die Förster-Gleichung beschrieben:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{mit} \quad R_0^6 = 8.79 \times 10^{23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda)$$

R_0 = Försterradius in Å
 r = Chromophorabstand
 Φ_D = Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors
 κ = Dipol-Orientierungsfaktor
 η = Brechungsindex
 J = spektrales Überlappungsintegral

Abbildung 2.1.2: Berechnung der Effizienz des Energietransfers nach Förster.

FRET-basierte Sonden finden besonders zur Untersuchung der Änderungen des Abstands und der Orientierung zweier Chromophore Verwendung. So wurden zahlreiche FRET-basierte Sonden zur Detektion von Nukleinsäuren^[51-53] und Enzymaktivität^[54, 55] (v.a. Proteasen) hergestellt. Letztlich bleibt anzumerken, dass je nach Fluoreszenzsonde und verwendetem Fluorophor bzw. *Quencher* mehrere Lösprozesse in unterschiedlich starker Ausprägung zusammenwirken.

2.2 DNA- und RNA-Analoga

Oligonukleotide dienen in zahlreichen biologischen und analytischen Anwendungen der Erkennung spezifischer Zielsequenzen. Neben den natürlich vorkommenden DNA- und RNA-Nukleotiden wurden vielfältige Modifikationen eingeführt, welche die Affinität der Oligonukleotide zu komplementären Zielsequenzen sowie ihre chemische und biologische Stabilität steigern (Abb. 2.2.1). Abgeleitet von RNA wurden verschiedene 2'-O-alkylierte Derivate untersucht, welche im Allgemeinen die Resistenz gegenüber Nukleaseverdau und die Schmelztemperatur entsprechender Duplexe steigern.^[56] Weit verbreitet ist dabei die Verwendung von vollständig 2'-O-Methyl-modifizierten Oligonukleotiden für fluoreszente Hybridisierungs sonden (*vide infra*).^[57] Für *Antisense*-Oligonukleotide werden hingegen häufig sogenannte „Flügelmere“ als Chimären aus DNA und 2'-O-Methyl bzw. längeren Alkylketten oder Alkoxygruppen verwendet werden.^[58, 59]

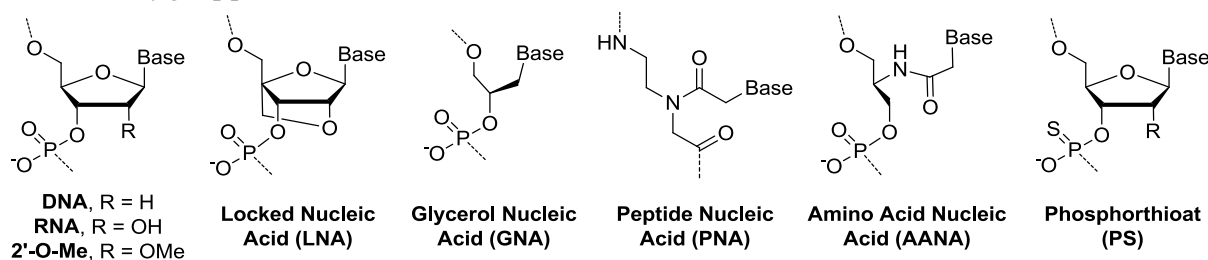


Abbildung 2.2.1: Chemische Strukturen von DNA, RNA sowie einiger ausgewählter Analoga.

Einen Spezialfall der 2'-O-Alkylierung stellt die von Wengel^[60, 61] und Imanishi^[62] entwickelte LNA (*Locked Nucleic Acid*) dar, welche die C₄-Position der Ribose und die 2'-Hydroxygruppe durch eine Methyleneinheit verbrückt. Durch diese bizyklische Modifikation wird der Zucker in der 3'-endo-Konformation fixiert, wodurch LNA-Heteroduplexe eine deutlich kompaktere Struktur ausbilden^[63-67] und eine drastische Zunahme ihrer Schmelztemperatur (bis zu 8 °C pro LNA-Modifikation) erfahren.^[68, 69] Letzteres bewirkt ebenfalls eine ausgezeichnete

Diskriminierung zwischen komplementären und Einzelbasen-fehlgepaarten Duplexen.^[70] Zusätzlich zeigt LNA eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleaseverdau.^[71, 72]

Die Synthese der GNA-Monomere (*Glycol* bzw. *Glycerol-Nucleic Acid*) ist auf Arbeiten von Ueda^[73] und Acevedo^[74] zurückzuführen und stellt mit lediglich einem Stereozentrum die wohl einfachste und atomökonomischste Variante der Nukleinsäuren dar – weswegen GNA als evolutionärer Vorläufer der RNA diskutiert wurde.^[75] Vollständig (S)-GNA-modifizierte Oligonukleotide können mit RNA, jedoch nicht mit DNA stabile Duplexe ausbilden.^[76, 77] Der Einbau einzelner GNA-Modifikationen erlaubt hingegen jegliche Duplexausbildung. Wenngleich GNA-Oligonukleotide zur klinischen Anwendung untersucht wurden, finden sie nur in vergleichsweise geringem Umfang Verwendung.^[78]

In der von Nielsen *et al.* entwickelten PNA (Peptid Nucleic Acid) wurde das Ribose-Phosphordiester-Rückgrat durch peptidisch verknüpfte, achirale Aminoethylglycin-Einheiten ersetzt.^[79] Die Nukleobasen sind durch eine weitere Peptidbindung über eine Carboxymethylen-Brücke an das Rückgrat angebunden. Aufgrund der strukturellen Unterschiede zu Nukleinsäuren und Peptiden, stellt PNA kein Enzymsubstrat dar und besitzt dadurch eine hervorragende biologische Stabilität.^[80] Durch die Vermeidung von Ladungsabstoßung mit den Phosphatgruppen und der großen Hydrophobie von PNA werden deutlich erhöhte Duplexstabilitäten mit komplementärer RNA und DNA erzielt.^[81] Dies bedingt ebenfalls die verminderte zelluläre Aufnahme, die geringe Löslichkeit in Wasser und die Tendenz zur Aggregation nicht-hybridisierter PNAs. Deshalb wurden für *in vivo* Anwendungen neben konventionellen Transfektionsmethoden^[82-85] verstärkt die Anbringung terminaler, polarer Aminosäuren,^[86] zellpenetrierender Peptide^[87] oder PNA-Monomere mit geladenen Seitengruppen (z.B. Guanidinium-modifizierte-PNA) eingesetzt.^[88-91]

Eine peptidische Anbindung der Nukleobasen unter Erhalt der Chiralität sowie des Phosphatrückgrats konnte durch AANAs (*Amino Acid Nucleic Acids*) verwirklicht werden.^[92, 93] Dabei imitierte die Hydroxygruppe in der Aminosäure-Seitenkette sowie die zum Alkohol reduzierte Carboxylgruppe die 3' bzw. 5'-Orientierung, während die Nukleobasen analog zur PNA mittels eines Carboxyalkyls mit dem Amin verknüpft sind. Neben Serin bzw. dem Serinol wurden ebenfalls Threoninol^[94] und Hydroxyprolinol^[95] als Rückgrat verwendet. Die peptidische Verknüpfung ist besonders zur internen Farbstoffmarkierung von Oligonukleotiden weit verbreitet (siehe Kapitel 2.4.3-2.4.5). Als weitere grundlegende Modifikation aller Phosphordiester-verknüpften Nukleotide kann das Phosphat durch ein Phosphorthioat ersetzt werden.^[96] Diese Modifikation erwies sich als ausgesprochen stabil gegenüber dem enzymatischem Verdau unter Erhalt der Induktion der RNase-H-Spaltung von Ziel-RNAs in *Antisense*-Oligonukleotiden.^[97, 98] Allerdings vermindert der Einbau von Phosphorthioaten die Duplexstabilität geringfügig und führt, aufgrund der vergrößerten Hydrophobie zu verstärkter unspezifischer Wechselwirkung.^[99]

2.3 DNA-Synthese

Mit Ausnahme der PNAs, welche nach den Methoden der Festphasen-Peptidsynthese aufgebaut werden, zeichnet sich die Oligonukleotidsynthese durch ihre hohe Effizienz,

besonders schnelle Kupplungschemie sowie vergleichsweise geringe Kosten aus. So sind Oligonukleotide mit einer großen Vielfalt an terminalen Modifikationen wie z.B. chemische Funktionalitäten (Alkine, Thiole, Amine), Farbstoffmoleküle und kleine, bioaktive Moleküle (Biotin, Niacin) von zahlreichen Herstellern kommerziell erhältlich. Der Synthesemaßstab reicht dabei von 40 nmol für analytische Anwendungen über die Synthese mehrerer μmol , z.B. für die NMR-Strukturanalyse bis in den mol-Bereich für therapeutische Anwendungen. Die Effizienz der Oligonukleotidsynthese wird durch zwei entscheidende Faktoren gewährleistet:^[100] 1) die Verwendung sehr reaktiver und gleichzeitig lagerstabiler Phosphoramidite, welche nach einer im Jahre 1980 von Marvin Caruthers entwickelten Methode zur Kupplung verwendet werden;^[101, 102] 2) die Synthese der Oligonukleotide auf der festen Phase,^[103] wodurch die einfache Abtrennung aller verwendeten Reagenzien gewährleistet wird – welche auf Arbeiten von Robert Letsinger^[104] und Bruce Merrifield^[105] zurückzuführen ist.

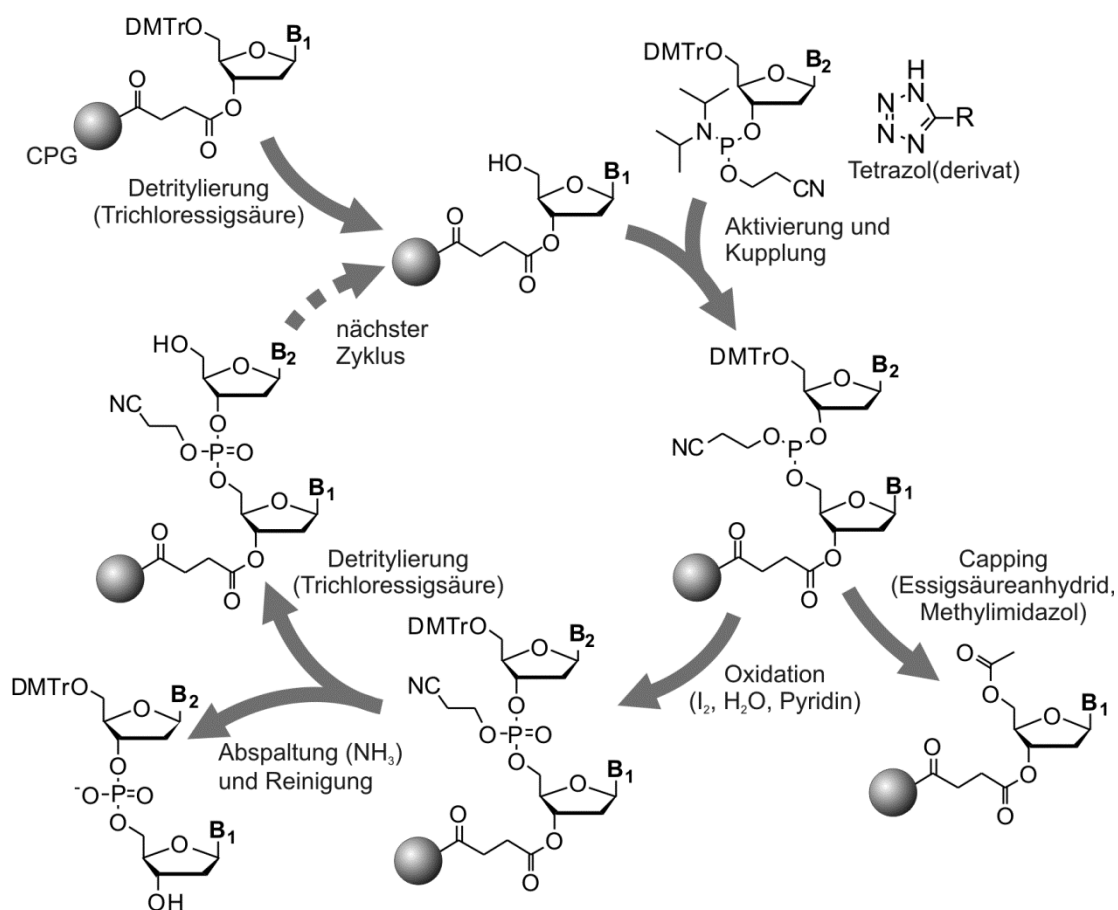


Abbildung 2.3.1: Synthesesyklus der Oligonukleotid-Festphasensynthese am Beispiel der DNA-Synthese.

Die Synthese von Oligonukleotiden (Abb. 2.3.1, hier exemplarisch am Beispiel der DNA gezeigt) erfolgt in der Regel auf CPG (*Controlled Pore Glas*), welches Poren von 500-2000 Å aufweist und über einen Bernsteinsäureester der 3'-Hydroxygruppe des ersten Nukleotids vorbeladen ist. Dadurch ergibt sich die Syntheserichtung vom 3'- zum 5'-Ende. Die inverse Synthese vom 5' zum 3'-Ende ist ebenfalls möglich, jedoch weit weniger gebräuchlich.^[106] Die säurelabile 5'-O-DMTr-Gruppe ist orthogonal zu den Schutzgruppen der exozyklischen

Amine der Nukleobasen, sodass die Behandlung mit Trichloressigsäure selektiv zur Detritylierung führt und den Syntheszyklus einleitet. Zur Kupplung des Phosphoramidits wird dieses durch schwach saures Tetrazol^[107, 108] bzw. Tetrazolderivate aktiviert und mit den Hydroxylgruppen auf dem CPG zum Phosphittriester umgesetzt.^[109-111] Nicht erfolgreich umgesetzte Hydroxylgruppen werden anschließend durch die Behandlung mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol blockiert (*Capping*), sodass diese in der weiteren Synthese nicht zu Deletionssequenzen führen. Der Phosphittriester wird anschließend durch die Behandlung mit einer Mischung aus Iod, Wasser und Pyridin zum Phosphorsäuretriester oxidiert und verhindert dabei die Spaltung der Phosphor(III)-Spezies in der nachfolgenden Detritylierung, welche den nächsten Syntheszyklus einleitet. Alternativ kann die Oxidation mittels schwefelhaltiger Reagenzien erfolgen, um Phosphorthioate zu bilden.^[112]

Nach Darstellung der gewünschten Oligonukleotidsequenz erfolgen simultan die Abspaltung von der festen Phase, die Deblockierung der exozyklischen Aminogruppen sowie das Entfernen der Cyanoethylgruppen durch die Behandlung mit wässrigem Ammoniak oder Methylamin. Unter diesen Bedingungen werden ebenfalls die acetylierten Abbruchsequenzen verseift, sodass deren Polarität gegenüber dem 5'-O-DMTr-tragenden Vollängenprodukt weiter gesteigert wird. Letzteres vereinfacht die Reinigung mittels Umkehrphasenchromatographie deutlich. Das Produkt kann durch die Behandlung mit Essigsäure von der DMTr-Gruppe befreit und ggf. erneut gereinigt werden (DMTr-on/off-Strategie). Darüber hinaus ist ebenfalls die Reinigung mittels Größenausschluss, Anionen-Austausch-Chromatographie oder Gelelektrophorese möglich.

2.4 Fluoreszenz-basierte Methoden zur RNA-Detektion *in-situ* und *in vivo*

Erste Experimente zur RNA-Detektion mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (*FISH*) basierten auf Biotin-markierten DNA-Oligonukleotiden, welche in *para*-Formaldehyd-fixierten Zellen mit der Ziel-RNA hybridisiert wurden. Die Detektion erfolgte durch die Behandlung mit Fluorescein-markiertem Avidin.^[113, 114] Durch die Fixierung der Zellen kann ein Großteil der überschüssigen Sonden bzw. des Avidin-Konjugats durch Waschschrte entfernt werden. Durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten DNA- bzw. 2'-O-Methyl-Oligonukleotiden wurde diese Methode deutlich vereinfacht und ebenfalls zur Detektion von RNA in lebenden Zellen verwendet.^[115-118] Singer *et al.* verwendeten mehrere DNAs mit bis zu fünf Chromophoren in *FISH*-Experimenten und demonstrierten damit die erste Einzelmolekül-Detektion von RNA *in-situ*.^[119, 120] Der Durchbruch von *smFISH* (*single molecule Fluorescence in-situ Hybridization*) gelang jedoch erst mit einer Entwicklung von Raj *et al.* aus dem Jahre 2008.^[121] Sie etablierten die Verwendung von 48 fluoreszenzmarkierten Sonden, welche komplementär zu derselben RNA sind (Abb. 2.4.1A). Solche SONDENSätze sind mittlerweile unter dem Namen *Stellaris-Probes* von *Biosearch Technologies* (Petaluma, USA) kommerziell erhältlich^[122] und finden vielfache Anwendung zur Detektion geringer Mengen an RNA in der biologischen und medizinischen Forschung.^[23, 123-125] Neuere Entwicklungen basieren auf *branched-DNA*, einer universellen, verzweigten Baumstruktur, welche ihre Sequenzspezifität lediglich durch kurze Adapter-Oligonukleotide erhält, sodass die

Baumstruktur sowie die markierten Oligonukleotide konstant gehalten werden können (Abb. 2.4.B).^[126-128] Durch die Verwendung nicht-responsiver Sonden ist das Entfernen überschüssiger, ungebundener Sonde durch Waschschritte unvermeidbar, wodurch diese Methoden in der Regel auf fixierte Zellen begrenzt sind.

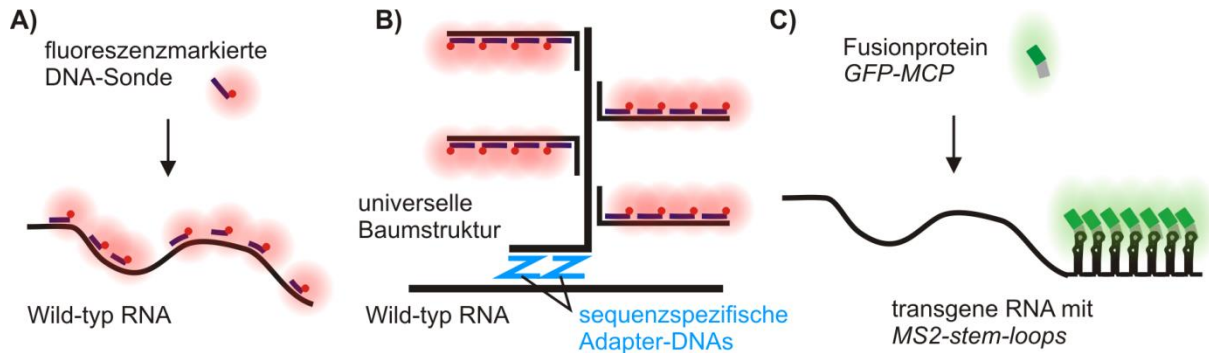


Abbildung 2.4.1: Schematische Darstellung des A) Konzepts des FISH mit mehreren einfach-markierten Sonden; B) Konzepts des FISH mit verzweigter Baumstruktur; C) MS2-MCP-GFP-Systems zur Detektion transgener RNA.

Als Ergänzung zur *in-situ* Hybridisierung ermöglichen biologische Methoden die Visualisierung transgener mRNA. Dazu wird die zu untersuchende RNA durch biochemische Methoden mit sogenannten *MS2-Stem-Loop*-Wiederholungseinheiten ausgestattet und transgen in Zellen exprimiert. Zusätzlich wird ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Fluoreszenzprotein (üblicherweise GFP oder mCherry) sowie einem *MS2-Coating-Protein* (MCP), exprimiert.^[129] Durch die Bindung des Fusionsproteins an die *MS2-Stem-Loop*-Strukturen kann die RNA mit mehreren fluoreszenten Proteinen dekoriert werden (Abb. 2.4.1C). Diese Methode ist besonders interessant, wenn die Verfolgung einzelner RNAs bzw. Ribonukleotidpartikeln (RNPs) benötigt wird. Da die Zellen konstant fluoreszentes Protein exprimieren, stellen *Photobleaching* sowie der Abbau des Proteins keine Limitierung dar und ermöglicht die RNA-Detektion über größere Zeiträume. Allerdings ist die Detektion auf transgene RNA beschränkt, sodass stets gründlich überprüft werden muss, ob die Expressionslevel vergleichbar mit der Wildtyp-RNA sind und das zusätzliche Molekulargewicht durch *Stem-Loop* (ca. 6 kDa) und MCP-FP (ca. 40 kDa) nicht die Lokalisation und Dynamik beeinflusst.^[130]

Für zahlreiche Anwendungen ist die Auflösung einzelner RNA-Moleküle jedoch nicht notwendig. So kommen RNAs in der Regel in ihrer Transportform, den RNPs vor. Diese Aggregate mehrerer RNAs und ihrer RNA-bindenden Proteine können bereits durch ein bzw. wenige Chromophore pro RNA visualisiert werden. So wurden neben den erwähnten Methoden zahlreiche Konzepte für Hybridisierungssonden entwickelt, die sich durch einen Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung auszeichnen und somit die Grundlage zur RNA-Detektion in Zellen ohne die Notwendigkeit von Waschschritten oder transgener Methoden bilden.^[131] Die Konzepte der Hybridisierungssonden lassen sich unabhängig von ihrer Funktionsgrundlage anhand einiger wesentlicher Parameter charakterisieren. Üblicherweise wird zwischen der Fluoreszenzintensität von ungebundener (I_0) und gebundener Sonde (I) unterschieden. Für eine effiziente Detektion wird ein großer Fluoreszenzanstieg (I/I_0) bei Hybridisierung angestrebt. Darüber hinaus sind die absolute Helligkeit der Sonde sowie der

Wellenlängenbereich der Emission von großer Bedeutung für biologische Anwendungen – eine Emission im grünen bis roten Bereich umgeht dabei die starke zelluläre Autofluoreszenz bei kürzeren Wellenlängen. Weiter zum Infrarot-Bereich verschobene Detektionsmöglichkeiten ermöglichen die Anwendung in intakten Geweben bzw. Organismen. Die Auswahl an Sondenkonzepten bzw. Varianten bestehender Konzepte ist sehr umfangreich, wovon jedoch nur wenige Konzepte in der Lebendzell-Bildgebung eingesetzt wurden. Die im Folgenden diskutierten Sondenkonzepte erheben daher keinen Anspruch auf Vollständigkeit sondern spiegeln die für diese Arbeit wichtigen Grundlagen wider.

2.4.1 Molecular Beacons

Die wohl am häufigsten verwendeten responsiven Sonden zur intrazellulären Nukleinsäure-detektion stellen die von Tyagi und Kramer entwickelten *Molecular Beacons* (MBs) dar.^[132] Das Grundkonzept besteht typischerweise aus einer 4-6 Nukleotide (Nt) langen, selbstkomplementären Stammregion, welche über eine, zur untersuchenden RNA komplementären, 15-25 Nt-langen Schleife verknüpft ist (Abb. 2.4.2A). In Abwesenheit der Zielsequenz zwingt die geschlossene Stammstruktur die am 3' bzw. 5' angebrachten Fluorophore bzw. *Quencher* in räumliche Nähe, wodurch die Fluoreszenz effizient gelöscht wird. Aufgrund ihres einfachen Designs und der Verwendung von terminalen Markierungen sind MBs von zahlreichen Herstellern kommerziell erhältlich. Die Hybridisierung der Schleifenstruktur mit der Zielsequenz erzwingt das Öffnen der Stammregion, sodass Fluorophor und *Quencher* räumlich getrennt werden. Damit einhergehend nimmt die Fluoreszenzlöschung ab, wodurch ein Fluoreszenzanstieg erhalten wird.

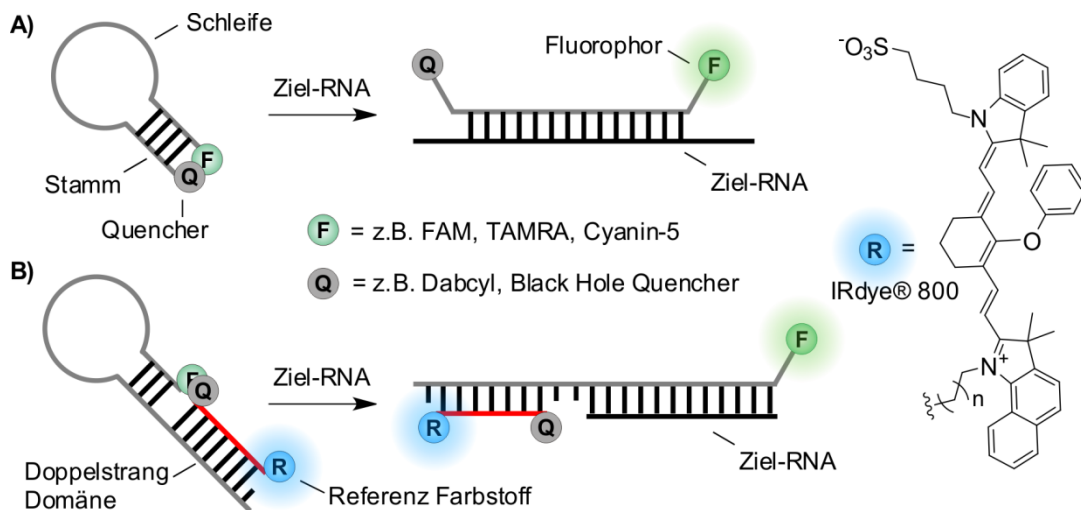


Abbildung 2.4.2: Schematische Darstellung des A) Konzepts der konventionellen *Molecular Beacons* (MBs) sowie der B) *Ratiometric Bimolecular Beacons* (RBMBs)

Optimale MB-Sonden zeigen bis zu 200-fache Fluoreszenzanstiege und sind zur Einzelbasendiskriminierung befähigt.^[133] Zur Optimierung stehen zahlreiche Parameter wie z.B. die Länge und die Sequenz, die Auswahl verschiedener Fluorophor-Quencher-Kombinationen sowie die Temperatur des Hybridisierungsexperiments zur Verfügung.^[134-137] DNA-*Molecular Beacons* finden vielfältige Anwendungen zur zellulären RNA-Detektion und in der PCR.^[138-141] Um falsch-positive Ergebnisse durch die räumliche Trennung von

Fluorophor und Quencher beim Abbau der Sonden durch Nukleasen zu vermeiden, wurden 2'-O-Methyl- und LNA-modifizierte MB-Varianten sowie Chimären eingeführt.^[142-146]

Neben den konventionellen MBs wurden zahlreiche Erweiterungen des Sondenkonzepts erarbeitet, wie z.B. stamm-markierte MBs,^[147, 148] dual Farbstoff-markierte MBs zum Förster-Resonanzenergietransfer^[52] sowie *Wavelength-Shifting MBs*^[53] und sogenannte *Dual-FRET-MBs* zur erhöhten Sequenzspezifität durch benachbarten Hybridisierung.^[149] Die kürzlich entwickelten *Ratiometric Bimolecular Beacons* (RBMBs) bestehen aus einem kurzen, Fluorophor-markierten und einem einseitig verlängerten Stamm, welcher mit einem zweiten Oligonukleotid hybridisiert wird.^[150] Dieses trägt den *Quencher* sowie einen nah-Infrarot (NIR) Farbstoff als zweiten Reporter (Abb. 2.4.2B). Bei Hybridisierung zur Zielsequenz werden Chromophor und *Quencher* räumlich getrennt, während das zweite Oligonukleotid unverändert an der Stammregion verbleibt. Das komplexe Design verhindert das unspezifische Öffnen der Stammregion und fördert, aufgrund der Duplexstruktur, den Verbleib der Sonde im Zytoplasma. Zusätzlich erlauben ratiometrische Messungen die Bestimmung der Sondenmenge in den untersuchten Zellen.^[150]

Analog zu den *MS2-Repeat Tags* wurden zudem von Vargas *et al.* Wiederholungseinheiten zur benachbarten Hybridisierung von bis zu 96 MBs entwickelt, um Einzelmolekülspektroskopie zu ermöglichen.^[151] Selbige Wiederholungseinheiten wurden ebenfalls von Tsourkas *et al.* zur quantitativen Analyse der transgenen RNA mittels RBMBs verwendet.^[152]

2.4.1 Thiazolorange-basierte Hybridisierungssonden

Einige Chromophore zeigen bei Wechselwirkung mit DNA stark veränderte Fluoreszenzeigenschaften. Beispielsweise interkalieren Ethidiumbromid und SYBR® Green I in DNA-Stränge unter dramatischem Anstieg ihrer Fluoreszenzemission. Dies wird in der Gelelektrophorese und der Echtzeit-PCR ausgenutzt, um die Anwesenheit bzw. Amplifizierung der DNA zu detektieren. Ebenfalls das für Fluoreszenzsonden sehr häufig verwendete Thiazolorange (TO) zeigt einen ca. 1000-fachen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute bei Anwesenheit von RNA oder DNA. Aufgrund dieser Responsivität, der geringen Größe sowie der Zellpermeabilität wurde TO erstmals von Lee *et al.* zur Durchflusszytometrie von Retikulozyten verwendet.^[153]

Durch NMR-Strukturanalyse und Viskosimetrie konnte belegt werden, dass TO und das Homodimer TOTO als bevorzugten Bindungsmodus in den DNA-Doppelstrang interkalieren (siehe Abb. 2.4.3 A), während viele andere Farbstoffe beispielsweise in die kleine Furche der Doppelhelix einlagern.^[154-156] Die optischen Eigenschaften von TO und weiteren asymmetrischen Cyaninfarbstoffen ist aufgrund der Interkalation und der Wechselwirkungen mit den umgebenden Nukleobasen stark von der Nukleotidsequenz abhängig; so wurden Unterschiede in der Absorption und Emission bei Interkalation von TO in Poly-dT, Poly-dG, usw. Sequenzen festgestellt.^[157] Der Mechanismus des Fluoreszenzanstiegs bei Interkalation begründet sich auf der Rotation um die zentrale Methinbrücke. Das freie Chromophor liegt nach Anregung in einen höheren angeregten Zustand in einer planaren *trans*-Konformation

vor, untergeht der internen Konversion in den S_1 und anschließend einer barrierefreien Torsion um die Methinbrücke. Bei Erreichen eines Torsionswinkels von ca. 60° wird das konjugierte System beider Heterozyklen unterbrochen. Schließlich kommt es bei perpendikulärer Orientierung (90°) zur konischen Durchdringung des S_1 und S_0 Zustands, sodass die weitere Relaxation durch interne Konversion zurück zum thermischen Gleichgewicht führt (Abb. 2.4.3B).^[158, 159] Ist diese Rotation nicht durch die Umgebung gehindert, so stellt sie den bevorzugten Relaxationsprozess des TO dar, wodurch die Quantenausbeute in Wasser extrem gering ausfällt ($\Phi = 0.0002$). Wird die Rotation gehindert, beispielsweise durch eine viskose Umgebung, so steigt die Fluoreszenz an, sodass z.B. in 90%-iger Glycerol-Lösung bereits ein 135-facher Anstieg der Quantenausbeute ($\Phi = 0.027$) zu beobachten ist.^[160]

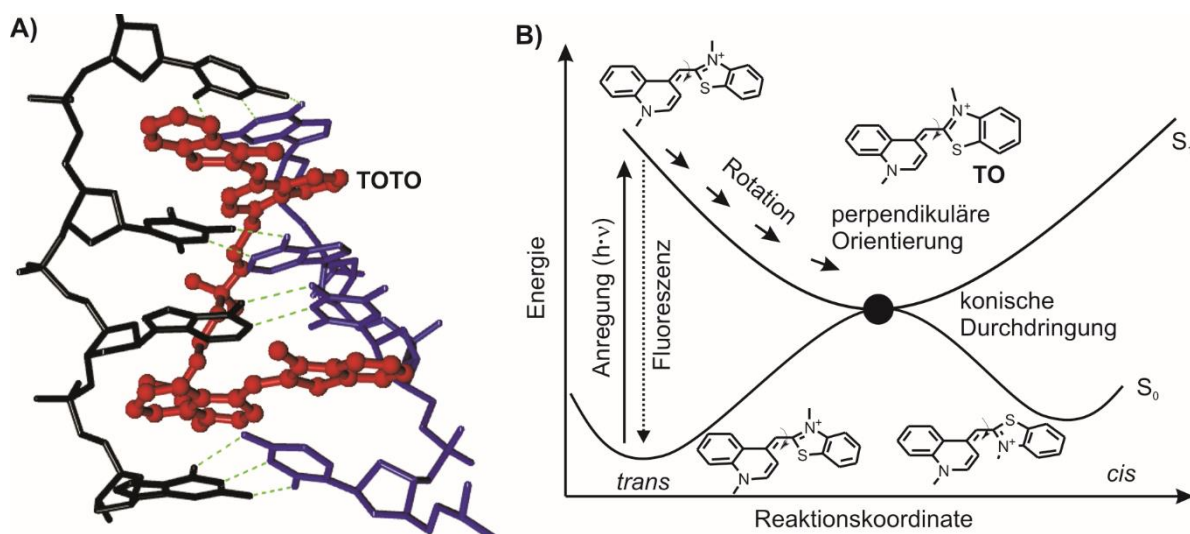


Abbildung 2.4.3: A) NMR-Struktur des TOTO-Dimer in DNA (PDB: 108D) B) Schematische Darstellung der Entvölkerung des angeregten Zustands bei Rotation um die Methinbrücke.

Analog dazu bewirkt die Interkalation in DNA ebenfalls eine drastische Reduzierung der Rotationsfreiheitsgrade und somit verstärkte Fluoreszenzemission. Während der freie Farbstoff in jegliche DNA interkalieren kann, wurde TO auch kovalent mit Oligonukleotiden verknüpft, um einen sequenzspezifischen Fluoreszenzanstieg zu erzielen.

2.4.2 Light-Up-Probes

Ein einfaches TO-basiertes Sondenkonzept stellt die von Svanvik *et al.* etablierte Verknüpfung des TO mit PNA-Oligomeren dar.^[157, 161] Dazu wurde TO mit einem langen, flexiblen Linker an den N-Terminus der PNA gebunden. Die flexible Anbindung erlaubt dem TO in Lösung Rotationsfreiheitsgrade, gleichzeitig verhindert das ungeladene PNA-Rückgrat eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Chromophor, sodass die Fluoreszenzquantenausbeute im Einzelstrang sehr gering ist.^[162] Die Hybridisierung mit komplementärer DNA ermöglicht die Interaktion des TO mit dem Duplex und bewirkt bis zu 45-fache Fluoreszenzintensivierung.^[161] Light-Up-Probes konnten erfolgreich in der Echtzeit-PCR eingesetzt werden^[163] und zeigten Einzelbasenspezifität in der homogenen DNA-Detektion von PCR-Produkten.^[164]

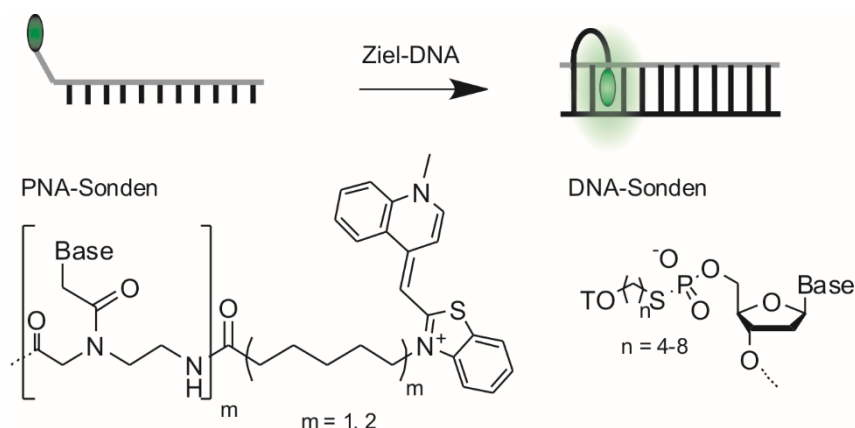


Abbildung 2.4.4: Schematische Darstellung der *Light-Up-Probes*.

Das Konzept der *Light-Up-Probes* wurde von Asseline *et al.* auf DNA-basierte Sonden übertragen und zur Detektion terminaler Basenfehlpaarungen eingesetzt.^[165-167] Die Anbringung des TO an die DNA-Oligonukleotide erfolgte dabei ebenfalls über lange, flexible Linker durch interne oder terminale Modifizierung des Phosphats (siehe Abb. 2.4.4). Für DNA-basierte Sonden wurden zahlreiche weitere Farbstoffe untersucht, die erzielten Fluoreszenzanstiege waren jedoch gegenüber den PNA-basierten *Light-Up-Probes* deutlich vermindert.^[168] Trotz der vielversprechenden Ergebnisse wurden dieses Sondenkonzepts bislang nicht zur Detektion von RNA in lebenden oder fixierten Zellen eingesetzt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der flexiblen Anbindung des Reporters liegen, welche die unspezifische Interaktion mit DNA bzw. RNA zulassen könnte.

2.4.3 Dual-markierte RNA- und DNA-Traffic Lights

In Arbeiten von Wagenknecht *et al.* wurden TO und Thiazolrot (TR, siehe Abb. 2.4.3) über einen flexiblen C₃-Linker und eine Carbamatgruppe an Aminopropandiol gebunden und als Nukleobasensurrogat in DNA-Oligonukleotide eingebaut.^[169, 170] Während die einfache, interne Markierung nur geringe Fluoreszenzanstiege erzielte, wurden responsive Sonden durch die kombinierte Verwendung zweier TO- bzw. TO- und TR-Einheiten erhalten.^[170, 171] Die schräg gegenüberliegende Positionierung der Chromophore in der Stammregion von *Molecular Beacon*-analogen Sonden (Abb. 2.4.5A) oder in *siRNA*-ähnlichen Duplexen (Abb. 2.4.5B) bewirkt eine excitonische Wechselwirkung der Farbstoffe und damit einhergehend eine Rotverschiebung der Emission. Im Falle der Kombination von TO und TR erfolgt zusätzlich ein Förster-Resonanzenergietransfer, woraus eine besonders geringe TO-Emission bei Aggregation resultiert.

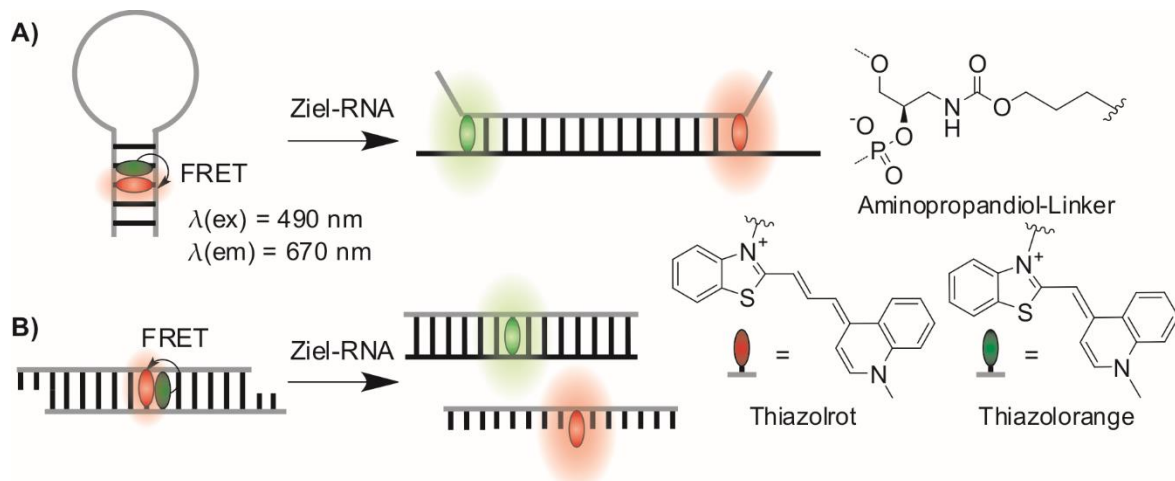


Abbildung 2.4.5: Konzept der Traffic-Light Sonden in A) stamm-markierten Molecular Beacons und B) siRNA.

Die Hybridisierung mit komplementären Zielsequenzen führt zur Auflösung der Aggregation und der Verschiebung des Emissionsmaximums zu normaler TO-Emission ($\lambda(\text{max}) \approx 530 \text{ nm}$).^[172] Bei TR und TO bedingt die räumliche Separierung zusätzlich einen verminderten Energietransfer, sodass nicht nur die TO-Emission ansteigt, sondern gleichzeitig die TR-Emission verringert wird. Die aufgrund des Farbwechsels (von ca. 660 nm zu ca. 530 nm) „traffic lights“ genannten Sonden erlauben die ratiometrische Messung der TO und TR-Fluoreszenz und ermöglichen damit die Integrität des Duplex in biologischen Anwendungen zu verfolgen.^[173, 174] TR und TO-markierte siRNA konnte in lebenden Zellen visualisiert werden, während die Herunterregulierung der Expression der Ziel-mRNA erhalten blieb.^[175]

2.4.4 Exciton-Controlled Hybridization Oligonucleotide (ECHO)-Probes

Die von Okamoto *et al.* entwickelten ECHO-Probes basieren ebenfalls auf der Aggregation zweier TO-Einheiten, welche über die Benzothiazoleinheit mit einem langen, flexiblen Linker an die C5-Position von Pyrimidinnukleosiden gebunden sind (siehe Abb. 2.4.6).^[46] In Abwesenheit komplementärer Zielsequenzen wird die Fluoreszenz durch die Ausbildung eines Excimers stark gelöscht.^[176, 177] Die Hybridisierung ermöglicht die Interaktion von TO und DNA, sodass die Aggregation aufgelöst und ein starker, bis zu 145-facher Fluoreszenzanstieg (für Oligo-A-Sonden) beobachtet wird.^[178] Im Allgemeinen zeigen ECHO-Probes eine größere Leistungsfähigkeit in A-T-reichen Sequenzen, während partielle Selbstkomplementarität, aufgrund der Ausbildung von Interstrang-Excimeren, deutlich verringerte Fluoreszenzanstiege liefert.^[179, 180]

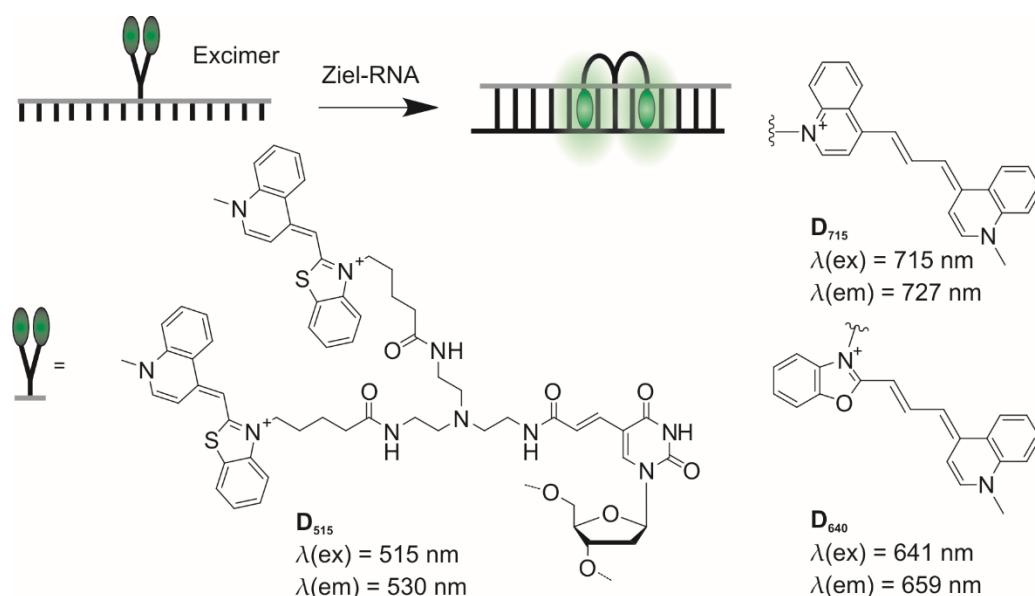


Abbildung 2.4.6: Konzept der *Exiton-Controlled Hybridization Oligonucleotide (ECHO)-Probes*.

Für erhöhte Nukleaseresistenz wurden 2'-O-Methyl-RNA und LNA-modifizierte ECHO-Probes eingeführt. Dabei zeigten 2'-O-Methyl-modifizierte Sonden leicht verbesserte Fluoreszenzeigenschaften, aufgrund effizienterer Fluoreszenzlöschung im Einzelstrang.^[178, 181] Das Konzept der *ECHO-Probes* konnte auf zahlreiche, strukturell ähnliche Chromophore ausgeweitet werden, wenngleich die Fluoreszenzanstiege unter Verwendung von TO mit Abstand am größten ausfielen.^[176, 182] Eine Modellstudie zur Dreifarb-Detektion unter Verwendung von verschiedenen, synthetischen Ziel-RNAs und komplementären Sonden mit unterschiedlichen Chromophoren demonstrierte eine potentielle Anwendung.^[176] Darüber hinaus wurden zwei orthogonale Wiederholungssequenzen für Sonden mit den Farbstoffen **D₅₁₄** und **D₆₄₀** beschrieben, welche ebenfalls in einer Modellstudie unter transienter Transfektion und Expression der Wiederholungssequenzen das Zweifarbexperiment ermöglichen.^[183]

2.4.5 PNA-Forced Intercalation (FIT)-Probes

Seitz *et al.* entwickelten das Konzept der erzwungenen Interkalation von Thiazolorange (FIT). In den PNA-basierten Sonden ist eine einzige Nukleobase durch das TO ersetzt.^[184, 185] Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Konzepten zeigte die Anbindung über den Chinolin-Stickstoff des TO und die Verwendung eines kurzen *Linkers* die höchsten Fluoreszenzanstiege. Die Verwendung längerer *Linker* und/oder die Anbindung über den Stickstoff des Benzothiazol resultierten in deutlich verminderter Responsivität.^[186] Durch die Anbindung des Chromophors analog zu den übrigen Basen (**Aeg(TO)**) wird dieses bei Hybridisierung in den Basenstapel gezwungen, wodurch die Rotation um die zentrale Methinbrücke stark eingeschränkt wird, sodass die Quantenausbeute im Vergleich zur ungebundenen Sonde ansteigt.^[187] Die Positionierung des Fluorophors im Basenstapel ermöglicht eine zweite Ebene der Selektivität: Bei Basenfehlpaarung in Nachbarschaft des TO ist die Rotation weniger stark eingeschränkt, wodurch die Fluoreszenz vermindert wird (Abb. 2.4.7A).^[188] Dies ermöglicht

die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen bei jeder Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur des Sonden-Target-Duplex und erlaubt den erfolgreichen Einsatz von PNA-FIT-Sonden in der quantitativen, Einzelbasen-spezifischen Echtzeit-PCR.^[189] Das Sondendesign konnte auf weitere asymmetrische Cyaninfarbstoffe ausgeweitet werden, jedoch wurde analog zu den Untersuchungen von Okamoto *et al.* stets die größte Responsivität bei Verwendung von TO festgestellt.^[190, 191]

Aufgrund der biologischen Stabilität PNA-basierter Sonden konnte FIT-PNA erfolgreich in der Detektion viraler mRNA *in vivo* eingesetzt werden.^[192] Die Einführung eines zweiten Reporters (**BO**, siehe Abb. 2.4.7A) ermöglichte die simultane Detektion zweier verschiedener viraler mRNAs in lebenden Zellen.^[191] Die Sonden wurden durch reversible Perforation der Zellmembran mittels Streptolysin-O in die Zellen eingeschleust, zusätzlich wurden terminale Polyethylenglycolketten angebracht, um die Wasserlöslichkeit der Sonden zu verbessern und somit Aggregation und unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden. Über die Arbeiten von Seitz *et al.* hinaus, wurde das FIT-Konzept von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt. Torres *et al.* modifizierten FIT-PNAs mit terminalen Aminosäuren (Lysin und Cystein), wodurch die Aufnahme in Huh7-Zellen und die Detektion von microRNA-122 ermöglicht wurde. Kam *et al.* verwendeten PNA-FIT-Sonden mit partiell komplementärer DNA zur konventionellen Transfektion mittels Lipofecatmin® und zeigten erstmals die Einzelbasenspezifität der FIT-Sonden in lebenden Zellen durch Detektion einer Mutation des *K-Ras*-Gens.^[193]

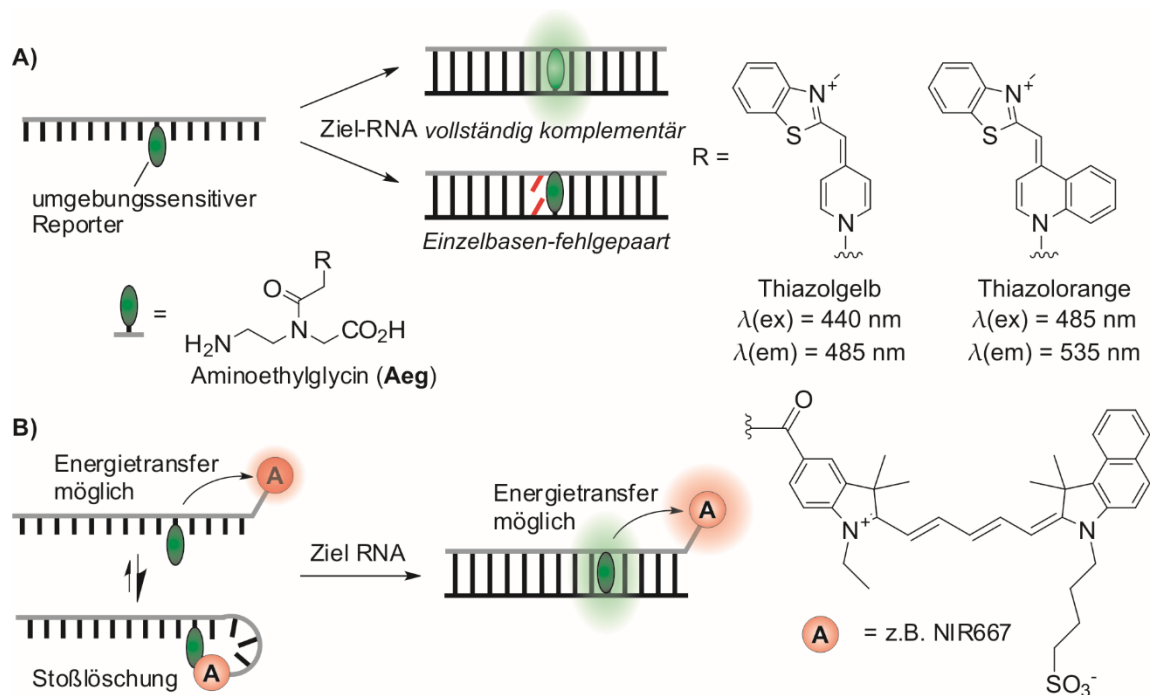


Abbildung 2.4.7: Prinzip der A) PNA-basierten FIT-Sonden und B) stammlosen PNA Beacons.

Socher *et al.* erweiterten das Konzept der FIT-Sonden um einen zweiten, terminal angebrachten Reporter und erzielten damit besonders responsive Sonden. In den sogenannten stammlosen PNA-Beacons kann ein Energietransfer von TO zum terminalen Reporter erfolgen; zusätzlich bedingt die Hydrophobizität des PNA-Rückgrats eine Aggregation der Sonden, sodass in Abwesenheit von komplementärer Zielsequenz sowohl der Donor als auch der

Akzeptor sehr effizient gelöscht werden (Abb. 2.4.7B).^[194] Bei Hybridisierung erfolgte bei kurzen Abständen und großer spektraler Überlappung von Donoremission und Akzeptorabsorption ein effizienter Energietransfer mit hervorragenden Fluoreszenzanstiegen (bis zu Faktor 254); bei geringer spektraler Überlappung und entsprechend verringertem Energietransfer wurde hingegen ein Anstieg der TO-Fluoreszenz von bis zu Faktor 450 erhalten.^[195] Dennoch werden die Fluoreszenzeigenschaften der FIT-Sonden hauptsächlich durch die Sondensequenz bestimmt, sodass für die jeweilige Zielsequenz eine Untersuchung zur optimalen Positionierung des TO notwendig ist.^[188, 196]

2.4.5.1 DNA-FIT-Sonden

Trotz der erfolgreichen Anwendungen und der Vorteile hinsichtlich biologischer Stabilität von PNA-FIT-Sonden, wurden Anstrengungen unternommen das Konzept der erzwungenen Interkalation auf DNA-basierte Sonden zu übertragen. Die Hydrophobie des ungeladenen PNA-Rückgrats erfordert Maßnahmen zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit (Lysine, PEG, DNA, siehe Kapitel 2.4.5). Zusätzlich ist die Handhabung DNA-basierter Sonden in biologischen Anwendungen langjährig etabliert, sodass DNA-FIT-Sonden die Anwenderfreundlichkeit des Sondenkonzepts verbessern sollten. Darüber hinaus ist die Synthese von PNA gegenüber DNA vergleichsweise zeitaufwendig und teuer, dies stellt besonders bei der Optimierung der Position von **Aeg(TO)** einen Nachteil dar.

Zum Ersatz einer Nukleobase durch TO in DNA musste ein Anbindungsmodus gefunden werden, welcher dem biologischen Vorbild ähnlich ist und starke Fluoreszenzanstiege ermöglicht. Es ist davon auszugehen, dass die bio-isostere, *N*-glycosidische Anbindung des Chinolins an Desoxyribose aufgrund des ausgeprägten Fluchtgruppencharakters nicht den Bedingungen der DNA-Synthese standhält. In Arbeiten von Bethge *et al.* wurde die Stabilisierung der *N*-glycosidischen Bindung durch 2'-Fluoro-Arabinose sowie die Anbindung des TOs an GNA- und Serinol-Monomere untersucht (Abb. 2.4.8).^[197] Während 2'-Fluoro-Arabinose keine ausreichende chemische Stabilität aufwies, konnten die unterschiedlich langen Anbindungsmodi von GNA und AANA zur Detektion von komplementärer und Einzelbasen-fehlgepaarter DNA untersucht werden.

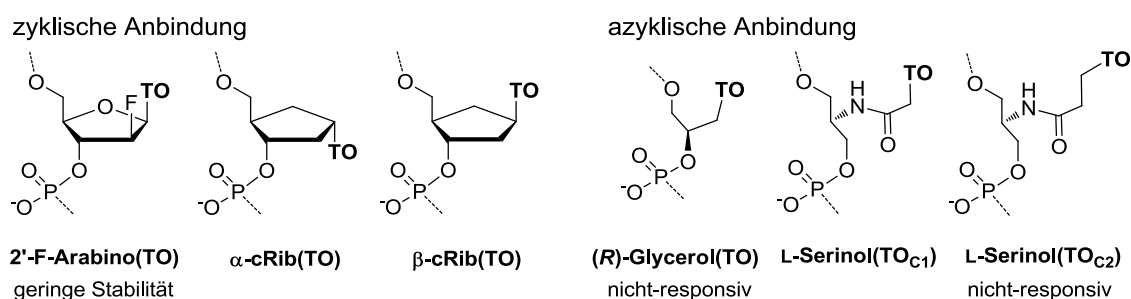


Abbildung 2.4.8: Verschiedene Anbindungsmodi zum Einbau von Thiazolorange in DNA.

Das im Vergleich zum natürlichen Vorbild um zwei Bindungen verkürzte Glycerol(TO) ergab, ebenso wie das um zwei Bindungen verlängerte Serinol(TO_{C2}), nahezu nicht-responsive Sonden. Im Rahmen dieser Studie stellte das Carboxymethylen-verknüpfte Serinol(TO_{C1}) mit

einem vierfachen Fluoreszenzanstieg das beste Ergebnis dar.^[197] Um verbesserte Fluoreszenzeigenschaften zu erhalten, synthetisierte Dr. Lucas Bethge basierend auf Arbeiten von Jessel *et al.*,^[198] im Rahmen seiner Doktorarbeit α - bzw. β -carbozyklische TO-Nukleoside, welche durch die Abwesenheit des endozyklischen Sauerstoffs eine große chemische Stabilität aufwiesen und erfolgreich in DNA-FIT-Sonden eingebaut werden konnten. In ersten Untersuchungen zur homogenen Detektion eines Segments der β -Aktin-mRNA zeigte sich die α -Konfiguration als wenig responsiv, während die β -Konfiguration einen maximalen Fluoreszenzanstieg von Faktor zwölf ermöglichte.^[199] Damit standen zwei Anbindungsmodi zur Verfügung, die eingehender untersucht und einem detaillierten Vergleich unterzogen werden können.

3. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit sollte die Verbesserung und Weiterentwicklung DNA-basierte FIT-Sonden zu einem robusten Werkzeug der RNA-Detektion in biologischen Fragestellungen sein. Vorhergehende Arbeiten befassten sich mit der Optimierung des Anbindungsmodus für TO in DNA-FIT-Sonden. Ein detaillierter Vergleich der bisher vielversprechendsten Kandidaten, dem azyklischen Serinol (**Ser**) sowie die carbozyklische Anbindung (**cRib**) der Fluoreszenzreporter BO und TO, stand bisher aus. Da die Fluoreszenzfarbstoffe als Nukleobasensurrogate mit den benachbarten Nukleobasen wechselwirken, sind die Fluoreszenzeigenschaften von FIT-Sonden vom Sequenzkontext abhängig. Als Maßstab zu deren Eignung in FIT-Sonden gilt deshalb neben einer starken Fluoreszenzerhöhung bei Hybridisierung, ebenfalls die Toleranz unterschiedlicher Sequenzumgebungen, um den Einsatz der Sonden für beliebige Zielsequenzen zu vereinfachen.

Über das FIT-Konzept hinaus ist der Austausch von Nukleobasen durch Chromophore in DNA-Strängen von generellem Interesse. Um in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Ernsting (HU-Berlin) die NMR-Struktur und die spektroskopischen Eigenschaften des stark solvatochromen 6-Hydroxychinolins (**6HC**) innerhalb der DNA zu untersuchen, sollte ein Anbindungsmodus gefunden werden, welcher neben einer hohen chemischen Stabilität ebenfalls eine Positionierung innerhalb der Doppelhelix ermöglicht und eine artifizielle Basenpaarung zulässt.

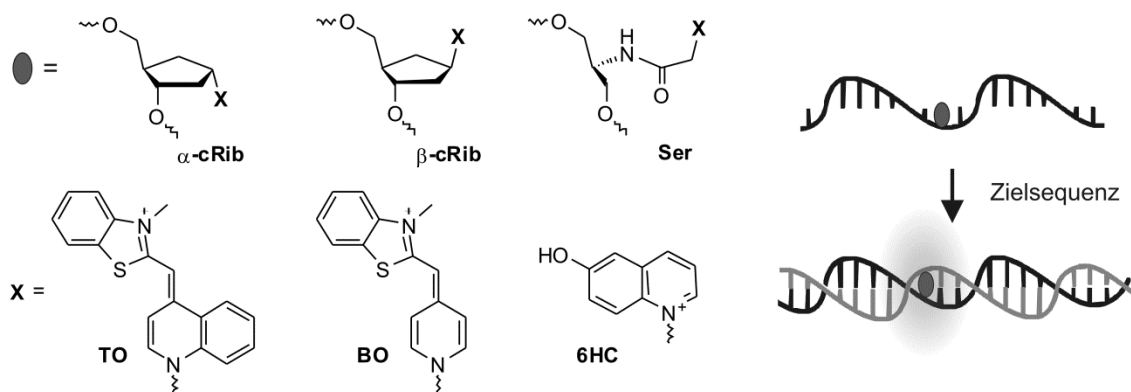


Abbildung 2.4.1: Anbindungsmodi und Chromophore für die interne Markierung von DNA-Oligonukleotiden.

Die existierenden Sondenkonzepte zur RNA-Detektion adressieren in der Regel allein den Fluoreszenzanstieg, nicht jedoch die Quantenausbeute sowie die absolute Helligkeit der Sonden. Dies ist besonders entscheidend, wenn starke zelluläre Autofluoreszenz überwunden werden muss oder sehr geringe Mengen an Ziel-Nukleinsäure detektiert werden sollen.^[200, 201] Zur Steigerung der Helligkeit von FIT-Sonden sollen unterschiedliche Strategien untersucht und mit etablierten Methoden der RNA-Detektion verglichen werden. Dies könnte durch das Ersetzen mehrerer natürlicher Nukleoside durch TO oder ähnliche Farbstoffe erzielt werden, sodass pro Sonde deutlich mehr Photonen absorbiert und emittiert werden können.

Andererseits eröffnet das einzigartige FIT-Konzept die Möglichkeit die Umgebung des TO-Reporters für eine maximale Quantenausbeute zu optimieren, wodurch ebenfalls die

Helligkeit ansteigen sollte. Durch DNA- bzw. RNA-Analoga können die Stabilität und die strukturellen Eigenschaften des Doppelstrangs beeinflusst werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verwendung von LNA und 2'-O-Methyl-RNA. Über die bekannte Zunahme der biologischen Stabilität hinaus, sollte durch diese Modifikationen die Duplexstruktur verfestigt werden, wodurch die intramolekulare Rotation des Chromophors um die zentrale Methinbrücke vermindert würde. Durch diese Strategie könnte sowohl die Nukleaseresistenz der Sonden als auch ihre Helligkeit für die RNA-Lebendzell-Bildgebung optimiert werden. Des Weiteren könnten FIT-Sonden die Grundlage für biologische Anwendungen bilden, welche bisher nicht oder nur unzureichend adressiert wurden. Ausgehend von der sequenzspezifischen Detektion soll das Design der FIT-Sonden für die jeweilige Fragestellung erweitert werden:

Für die Quantifizierung zellulärer Ziel-RNA können die FIT-Sonden mit einem zusätzlichen, von TO und dem Hybridisierungszustand unabhängigen Reporter ausgestattet werden. Dieser sollte einen Rückschluss auf die Sondenkonzentration zulassen, während das TO-Signal bzw. die Ratio beider Reportersignale die An- bzw. Abwesenheit von Ziel-RNA anzeigt. Im Gegensatz zu PNA-basierten Sonden, sollte das polare DNA-Rückgrat hydrophobe Wechselwirkungen und Aggregation der Reportermoleküle effizient vermeiden, sodass ein weitgehend ungestörter, Reporterkanal erhalten wird.

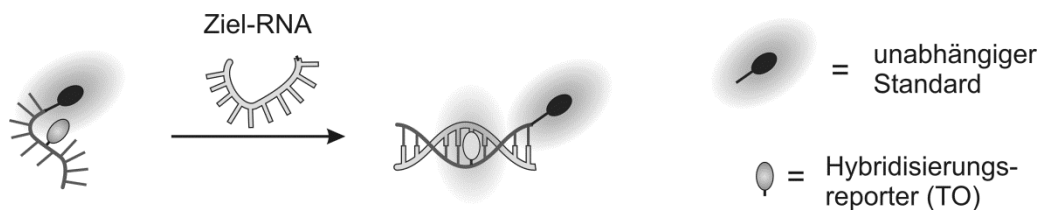


Abbildung 2.4.2: Prinzip der RNA-Quantifizierung durch dual-markierte FIT-Sonden.

Die Einzelbasenspezifität der FIT-Sonden ermöglicht die Detektion von Nukleinsäuren, welche sich lediglich in einer einzigen Nukleobase unterscheiden. Durch mehrere spektral unterschiedliche Fluoreszenzreporter für FIT-Sonden wird angestrebt verschiedene Einzelnukleotidvariationen simultan zu detektieren.

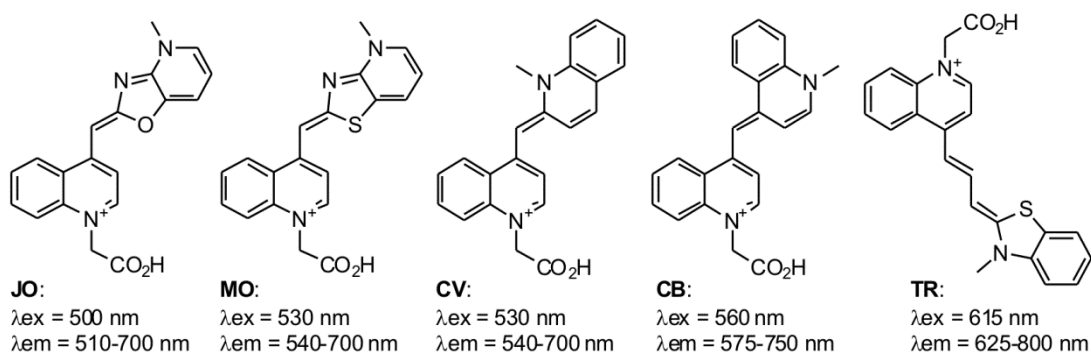


Abbildung 2.4.3: Zusätzliche Fluoreszenzreporter für DNA-basierte FIT-Sonden.

Dies ist besonders bei der RNA-Editierung, der post-transkriptionalen enzymatischen Transaminierung von Nukleobasen von großer Bedeutung. Die Detektion von RNA-Editierung wurde mit Hybridisierungssonden bisher nicht gezeigt – möglicherweise aufgrund der großen Anforderungen an die Einzelbasenspezifität. Durch die bildgebende Darstellung

der RNA-Editierung in Zellen könnten wertvolle Informationen über die räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge der Editierungsprozesse gewonnen werden.

Ebenfalls sollen Wiederholungseinheiten zur benachbarten Hybridisierung mehrerer FIT-Sonden untersucht werden. Mittels transgener Methoden könnte durch die Dekoration einer RNA mit zahlreichen Sonden eine Einzelmolekülaufösung – ähnlich dem MS2-System – erzielt werden. Im Gegensatz zum MS2-Fluoreszenzprotein-System erlauben FIT-Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen und aufgrund ihrer Sequenzspezifität Mehrfarbanwendungen. Da die Expression transgener RNAs in der Biologie weit verbreitet und etabliert ist, könnten mit wenigen optimierten FIT-Sonden die Detektion zahlreicher verschiedener RNAs ermöglicht werden – ohne die Notwendigkeit der Synthese jeweils sequenzspezifischer Sonden. Dadurch könnten FIT-Sonden zu einem universellen Werkzeug in der RNA-Detektion werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vergleich der Anbindung von TO über Serinol und Carbozyklus

Fluoreszente Nukleosidanaloga können anstelle von natürlichen Nukleosiden in DNA-Oligonukleotiden platziert werden und ermöglichen Untersuchungen der globalen und lokalen Struktur, der Dynamik sowie der Umgebung der Nukleinsäure.^[202] Darüber hinaus bietet das DNA-Rückgrat eine ausgezeichnete Möglichkeit, Chromophore zu clustern, wodurch einzigartige Fluoreszenzeigenschaften erhalten werden,^[203, 204] welche die Grundlage für DNA-basierte Sensoren für flüchtige Bestandteile oder Schwermetalle bieten.^[205-208] Ebenfalls für die Nukleinsäure-Detektion sind fluoreszente Nukleosidanaloga ein wertvolles Werkzeug und stellen eine vielversprechende Alternative zu 3'- und 5'-terminal-markierten Hybridisierungssonden dar.

Es gibt jedoch nur wenige literaturbekannte Beispiele für einfach-markierte Hybridisierungs-sonden mit großer Responsivität. Meist wird das umgebungssensitive Thiazolorange (TO) oder strukturell ähnliche, asymmetrische Cyaninfarbstoffe, welche auf zunehmende Viskosität durch Hybridisierung mit einem Fluoreszenzanstieg reagieren verwendet.^[157] Die verschiedenen Sondenkonzepte unterscheiden sich im Anbindungsmodus der Reporter. Allein das Konzept der erzwungenen Interkalation basiert auf einem kurzen, wenig flexiblen *Linker* (vgl. Kapitel 2.4.5); andere Konzepte von Kubista, Asseline, und Wagenknecht verwenden stets lange, azyklische *Linker* (C₃ bis C₁₀), die ein „Zurückfallen“ des Reporters in den Basenstapel oder in eine Furche des Duplex erlauben.^[161, 165, 170] Untersuchungen an FIT-PNA verdeutlichten die Notwendigkeit eines kurzen *Linkers*, um Sonden mit hoher Leistungsfähigkeit zu erhalten. Für DNA-FIT-Sonden erweis es sich in ersten Untersuchungen als herausfordernd eine geeignete Anbindung des Chromophors an das Rückgrat zu finden, da zahlreiche Nukleosidanaloga mit kürzerem oder längerem *Linker* nur geringe oder keine Responsivität gegenüber komplementärer DNA aufwiesen.^[197] Für die Lebendzell-Bildgebung ist besonders die RNA-Detektion von Interesse, bislang war jedoch nicht bekannt wie sich DNA-basierte FIT-Sonden bei Hybridisierung mit komplementärer RNA verhalten. Deshalb wurden die vielversprechendsten Anbindungsmodi (L-Serinol (**Ser**) sowie der α - und der β -verknüpfte Carbozyklus (**α -cRib** und **β -cRib**)) mit den Farbstoffen Thiazolgelb (BO) und Thiazolorange (TO) verknüpft und ihre Eignung zur homogenen Detektion von RNA untersucht (Abb. 4.1.1). Ein Vergleich von jeweils zehn Positionen innerhalb einer Sequenz sollte die Entscheidung über den optimalen Anbindungsmodus für zukünftige Anwendungen in DNA-FIT-Sonden ermitteln.

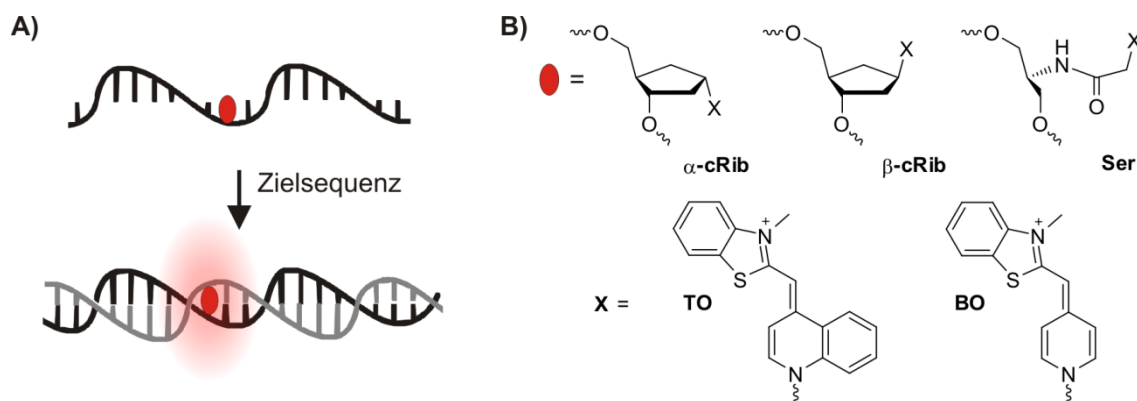


Abbildung 4.1.1: A) FIT-Konzept und B) verwendete Anbindungsmodi und Farbstoffe.

4.1.1 Synthese von Ser(TO) und Ser(BO)

Für die Anbindung der asymmetrischen Cyaninfarbstoffe BO und TO an das Serinolrückgrat wurden diese mit einer Carboxymethylgruppe funktionalisiert (Abb. 4.1.2). Zur Darstellung von **BO**_{Cl} (**5**) wurde γ -Picolin (**1**) mit Bromessigsäure in Ethylacetat alkyliert. Analog wurde zur Synthese von **TO**_{Cl} (**8**) 4-Methylchinolin (**6**) mit Bromessigsäure umgesetzt. 3-Methyl-2-mercaptomethylbenzothiazoliumtosylat (**4**) wurde durch sukzessive Methylierung des Thiols und des Stickstoffs von 2-Mercaptobenzothiazol (**3**) erhalten. Der Aufbau der Farbstoffe **5** bzw. **9** erfolgte nach der Methode von Brooker *et. al* unter basischen Bedingungen bei Raumtemperatur unter Eliminierung von Methylmercaptan.^[209]

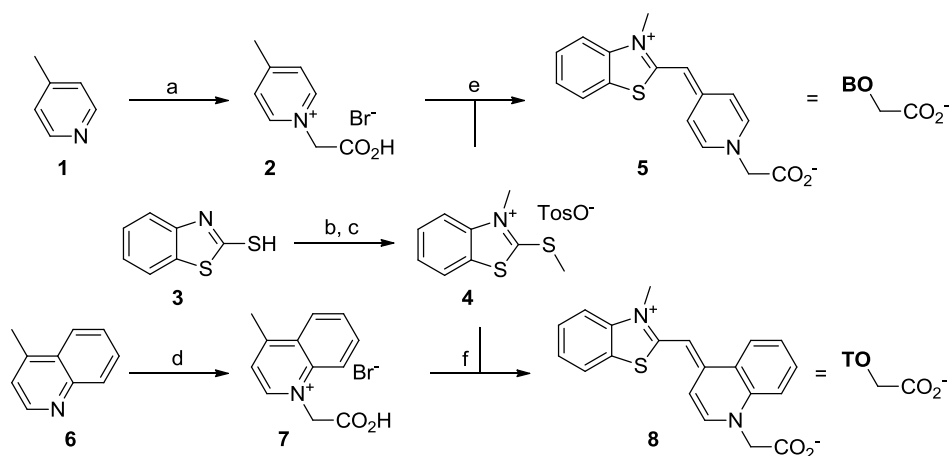


Abbildung 4.1.2: Synthese von **BO**_{Cl} (**5**) und **TO**_{Cl} (**8**); a) Bromessigsäure, EtOAc, 77%; b) MeI, DMF, K₂CO₃, 82%; c) TosOMe, 130 °C, 91%; d) Bromessigsäure, EtOAc, 54%; e) NEt₃, CH₂Cl₂, 73%; f) NEt₃, CH₂Cl₂, 68%.

Das Serinolrückgrat (**13**) lässt sich in einer linearen fünfstufigen Synthese ausgehend von L-Serin (**9**) darstellen und ist auf Arbeiten von Benhida^[93] und Bethge^[197] zurückzuführen (Abb. 4.1.3). Zunächst wurde der Serinmethylester mittels Schotten-Baumann-Veresterung dargestellt und anschließend die Aminogruppe in das Trifluoracetamid **10** überführt. Nach Blockierung der Hydroxylgruppe durch Dimethoxytritylchlorid (Verbindung **11**) wurden simultan der Ester und das Amid mittels LiBH₄ reduziert und der erhaltene Alkohol **12** durch TBSCl (*tert*-Butyldimethylsilylchlorid) geschützt (**13**). Erst auf dieser Stufe erfolgt die flashchromatographische Reinigung des orthogonal-geschützten Serinols (**13**), welches in einer Ausbeute von 55% über fünf Stufen erhalten wurde.

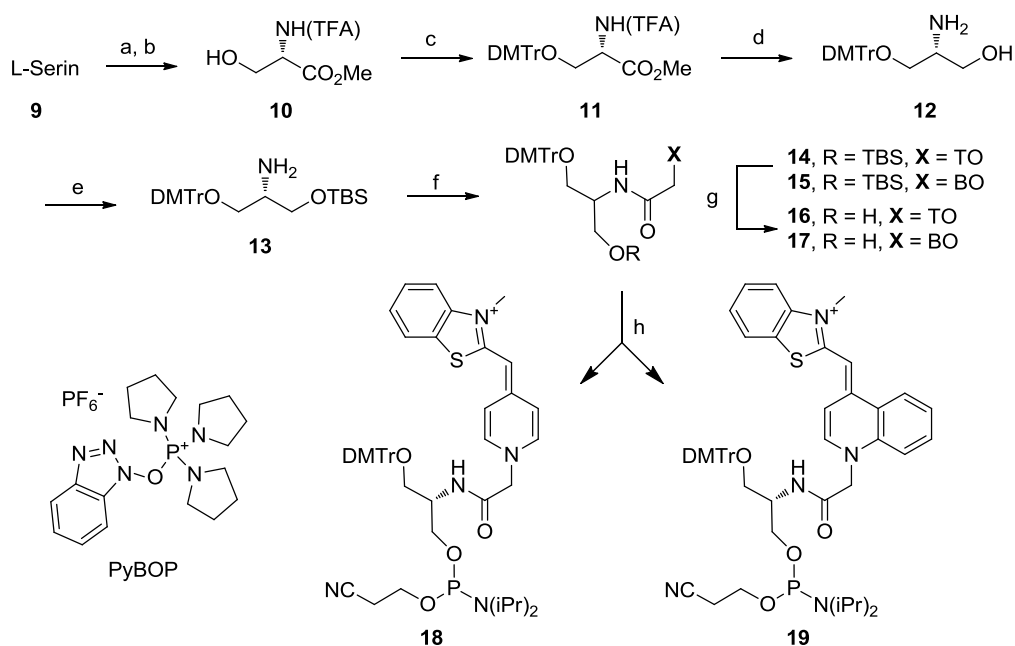


Abbildung 4.1.3: Synthese von **Ser(BO)** und Ser(TO); a) Thionylchlorid, MeOH, quantitativ b) Ethyltrifluoracetat, NEt₃, MeOH, 87%; c) DMTrCl, Pyridin, 98%; d) LiBH₄, THF, MeOH, 72%; e) TBSCl, NEt₃, CH₂Cl₂, 89%; f) **BO**Cl bzw. **TO**Cl, PyBOP, NMM, PPTS, DMF, 56-78%; g) TBAF·3H₂O, THF, 50-75%; h) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Et₂NiPr, CH₂Cl₂, 70-90%.

Die Kupplung der Farbstoffe **BO**_{Cl} (**5**) bzw. und **TO**_{Cl} (**8**) erfolgte durch PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat) in Anwesenheit von NMM (*N*-Methylmorpholin) und PPTS (Pyridinium-*p*-toluolsulfonat) als Löslichkeitsvermittler und Protonenquelle in DMF. Die Bildung des Farbstoff-Aktivesters vor Zugabe des Serinolrückgrats (**13**) war durch das Aufklaren der Suspension zu erkennen und erwies sich als essentiell für das Gelingen der Reaktion in guten Ausbeuten (56-78%). Nach der flashchromatographischen Reinigung wurde die Silylgruppe durch Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (TBAF·3H₂O) entfernt und das Produkt (**16** bzw. **17**) durch Azeotroprektifikation (Co-Destillation) mit Pyridin von überschüssigem Wasser entfernt. Die Synthese der Alkohole **16** bzw. **17** konnte im Multigramm-Maßstab problemlos durchgeführt werden. Hingegen musste die Synthese der **Ser(TO)** bzw. **Ser(BO)**-Phosphoramidite mittels 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit stets frisch vor der DNA-Synthese erfolgen, da sich **18** bzw. **19** als nicht-lagerstabil erwiesen. Zwar konnten die Phosphoramidite mittels Flashchromatographie gereinigt werden, jedoch zeigte diese Maßnahme gegenüber der wässrigen Aufarbeitung keine Verbesserung bezüglich Lagerstabilität und der Kupplungsausbeute in der DNA-Synthese.

4.1.2 Synthese der Carbozyklus-BO-Konjugate

Die Synthese des carbozyklischen Vorläufers (**21**) basiert auf einer Methode von Jessel *et. al.*^[198] und wurde bereits zur Synthese von carbozyklischen TO-Konjugaten (**cRib(TO)**) von Dr. Lucas Bethge adaptiert. Aus diesem Grund wird die Darstellung des Vorläufers **21** nicht weiter erläutert. In Arbeiten von Dr. Lucas Bethge konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Substitution des pseudo-alpha-ständigen Methansulfonats in **22** das beste Ergebnis für die

Konjugation des Lepidins lieferte, obwohl die harschen Reaktionsbedingungen die Substitution teilweise in einen Mechanismus erster Ordnung zwingen, sodass keine vollständige Inversion der Konfiguration erhalten wurde.^[199] Da für die Optimierung des Anbindungsmodus ohnehin das α - und das β -konfigurierte BO-Nukleosid (**26 α** und **26 β**) untersucht werden sollten, stellte sich dieser Umstand als vorteilhaft heraus. Im Gegensatz zur Synthese des **cRib(TO)** verläuft die Substitution mit γ -Picolin in guten Ausbeuten unter vergleichsweise milden Bedingungen. Somit wurden nach dem Aufbau des BO-Chromophors verbesserte Selektivitäten von **23 α / β** erhalten (α : β = 1:4, im Vergleich TO α : β = 1:1.5).^[199] Die Mischung der Diastereomere konnte erst nach Entfernen der Benzylgruppen mittels BBr₃ und der Blockierung der primären Hydroxylgruppe mittels DMTr-Cl durchgeführt werden. Die Synthese und Handhabung der carbozyklischen BO-Phosphoramidite erfolgten analog zu den Serinol-Farbstoffkonjugaten. Aufgrund der relativ komplexen Syntheseprozedur, dem Aufbau der Stereozentren und den geringen Ausbeuten konnten die carbozyklisch-verknüpften Farbstoffkonjugate (verglichen mit Serinol-Farbstoffkonjugaten) nur in kleinen Mengen dargestellt werden.

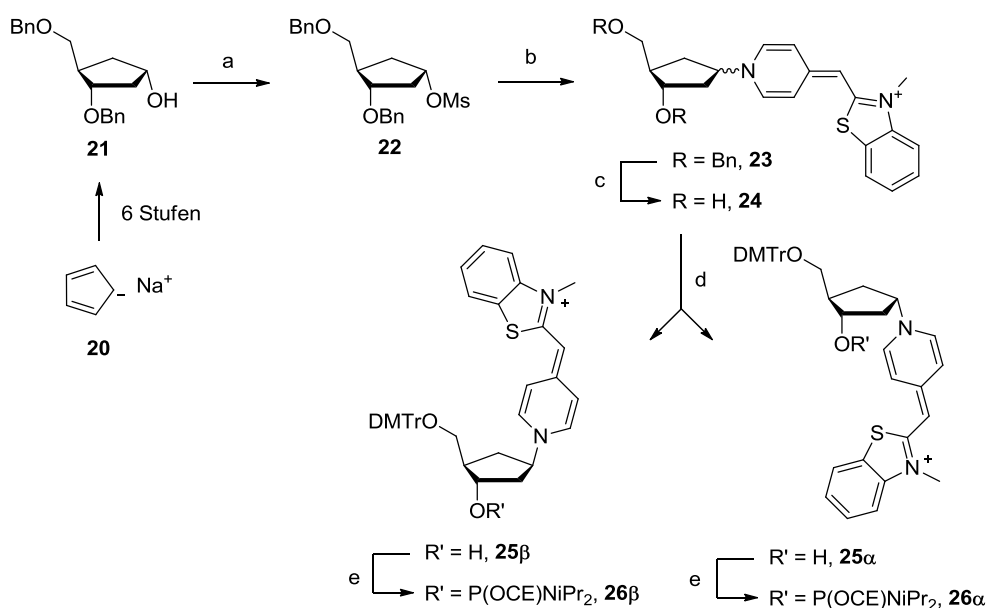


Abbildung 4.1.4: Synthese der carbozyklischen BO-Monomere **26 α** und **26 β** ; a) MsCl, NEt₃, CH₂Cl₂, 93%; b) γ -Picolin, 20 h, 60 °C, dann 3-Methyl-2-thiomethyl-benzothiazoliumtosylat, NEt₃, 58%; c) BBr₃, CH₂Cl₂, quant.; d) DMTrCl, KPF₆, Et₃NiPr, 71%, Trennung der Diastereomere: α = 14%, β = 57%; e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Et₃NiPr, CH₂Cl₂, 70-90%.

4.1.3 Auswahl der Sequenzen und Synthese von DNA-FIT-Sonden

Aus Arbeiten von Dr. Dilip Jarikote geht hervor, dass der Sequenzkontext einen dramatischen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von PNA-FIT-Sonden hat.^[210] Ähnliche Beobachtungen konnten auch in ersten Experimenten mit DNA-FIT-Sonden gemacht werden.^[197] Um diesen Sachverhalt detaillierter zu untersuchen und die Nützlichkeit der verschiedenen Anbindungsmodi zu vergleichen, wurden die fluoreszenten Nukleosidanaloga an jeweils zehn Positionen eines Sequenzabschnitts eingebaut. Als Zielsequenz der TO-Sonden wurde β -Aktin mRNA von MDCK-Zellen (*Madin Darby Canine Kidney*) verwendet

(Pos. 1138-1163 der mRNA, Abb. 4.1.5). Die Synthese und Charakterisierung der α - bzw. β -**cRib(TO)**-Sonden wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Lucas Bethge angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für BO-Sonden wurde ein Segment der mRNA codierend für *Neuraminidase* von *Influenza-H1N1/A/PR/8*-Viren ausgewählt (Pos. 582-608, Abb. 4.5), welches bereits erfolgreich in der Lebendzell-Bildgebung mit *Molecular Beacons* visualisiert wurde.^[141] Die Kombination von BO- und TO-Sonden könnte in späteren Anwendungen ein Zweifarb-Experiment erlauben, bei welchem die β -Aktin-Sonde als interner Standard und die *Neuraminidase*-Sonde zur Bestimmung der viralen Infektion verwendet werden könnte. Die simultane Verwendung von BO- und TO-Sonden konnte bereits erfolgreich mit FIT-PNA gezeigt werden.^[191]

β -Aktin-RNA: 5' ACACAGAGTACTTGCGCTCAGGGGGTG 3'
 β -Aktin-Sonde: 3' UGUGUCUAUGAACGCGAGUCCCCAC 5'
Neuraminidase-RNA: 5' GGTTCAGTTATTATGCCGTTGTATTT 3'
Neuraminidase-Sonde: 3' CCAAAGUCAUAUACGGCAACAUA 5'

Abbildung 4.1.5: RNA-Zielsequenzen und Sonden; Nukleotide, die durch TO bzw. BO ersetzt werden, sind fett und unterstrichen markiert.

Die Synthese der DNA-FIT-Sonden erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode (vgl. Kap. 2.3). Unabhängig vom verwendeten Anbindungsmodus und vom Farbstoff, konnte laut „Tritylmonitor“ der Syntheseautomaten stets eine hohe Kupplungseffizienz erzielt werden (Abb. 4.1.6A). Die besten Ergebnisse wurden durch Lagerung der gelösten Phosphoramidite über aktiviertem Molekularsieb erzielt. Da die Farbstoffe der alkalischen Hydrolyse an der Methinbrücke unterliegen, musste die finale Abspaltung der Schutzgruppen und von der festen Phase optimiert werden. Die Verwendung von dG^{DMF} anstelle von dG^{iBu} ermöglichte die Freisetzung der Sonden durch wässrigen Ammoniak innerhalb von 2 h bei 55 °C. Die üblicherweise beschriebene Behandlung über 4 h bei 55 °C resultierte hingegen in der basischen Hydrolyse der Chromophore.

Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte durch Umkehrphasenchromatographie nach DMTr-on/off-Strategie. Die Identität und Reinheit der Sonden wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und analytische HPLC-RP-UV/Vis bestimmt (Abb. 4.1.6B).

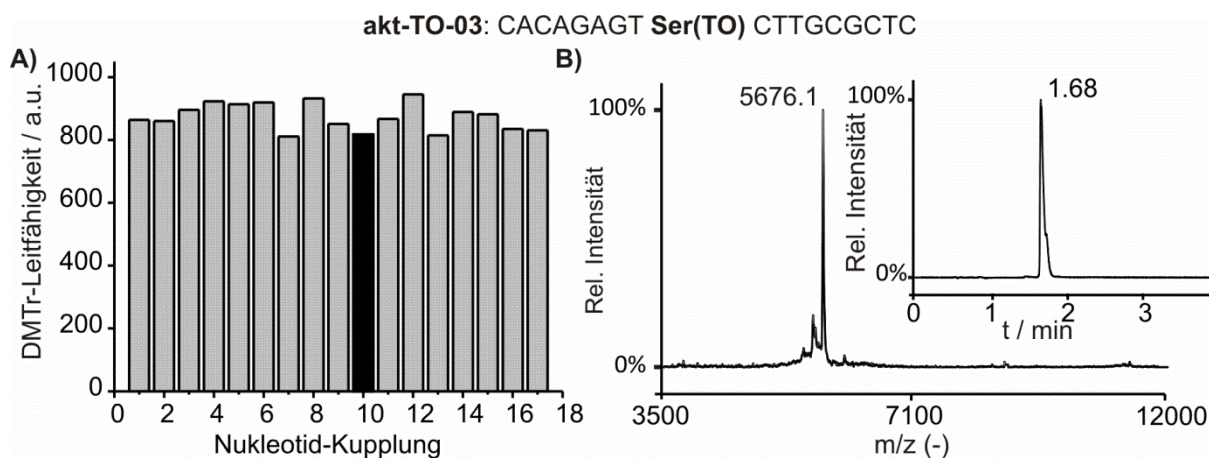


Abbildung 4.1.6: A) DMTr-Leitfähigkeitsdetektion während der DNA-Synthese, schwarzer Balken entspricht der Abspaltung der DMTr-Gruppe nach der **Ser(TO)**-Kupplung; B) exemplarisches MALDI-TOF-MS sowie analytische UPLC-RP-UV der gereinigten Sonde **akt-Ser(TO)-03**.

4.1.4 Charakterisierung der Sonden und Vergleich der Anbindungsmodi

Die hergestellten Sonden wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenzerhöhung bei Hybridisierung mit komplementärer RNA sowie der Duplexstabilität mittels UV-Schmelzkurvenanalyse untersucht (siehe Tabelle 4.1.1, Beispiele sind in Abb. 4.1.7 gezeigt). Zum Vergleich wurde von den Sonden **akt-TO-02**, **akt-TO-03** und **akt-TO-04** die Schmelztemperatur der unmodifizierten Oligonukleotide untersucht (**akt-02**: 61 °C, **akt-03**: 58 °C, **akt-04**: 63 °C). **β-cRib(TO)** und **Ser(TO)** zeigten eine Verringerung der Stabilität von ca. 1 °C bei Ersatz eines AT-Paares durch TO bzw. eine Verringerung von 2-4 °C bei Ersatz eines GC-Paares, während **α-cRib(TO)** im Allgemeinen vergrößerte Duplexstabilitäten (3-5 °C) bewirkte.

Tabelle 4.1.1: Vergleich verschiedener Anbindungsmodi für TO.

akt-	Sequenz, X = Linker (TO)	β-cRib(TO)		α-cRib(TO)		Ser(TO)	
		T _M / °C	I/I ₀	T _M / °C	I/I ₀	T _M / °C	I/I ₀
TO-01	ACACAGAG X ACTTGCGCT	54	0.8	62	1.6	54	2.8
TO-02	CACAGAGT X CTTGCGCTC	60	2.8	66	0.9	60	4.1
TO-03	ACAGAGTA X TTGCGCTCA	54	1.9	61	1.4	56	6.3
TO-04	CAGAGTAC X TGCGCTCAG	62	11.7	66	2.2	62	6.9
TO-05	AGAGTACT X GCGCTCAGG	64	1.0	66	0.6	64	1.7
TO-06	GAGTACTT X CGCTCAGGG	64	1.0	68	0.4	63	1.0
TO-07	AGTACTTG X GCTCAGGGG	62	0.4	54	1.0	61	1.4
TO-08	GTACTTGC X CTCAGGGGG	68	3.6	72	0.6	68	3.7
TO-09	TACTTGCG X TCAGGGGGT	65	2.0	67	2.0	64	4.9
TO-10	ACTTGCGC X CAGGGGGTG	68	0.5	74	1.2	67	4.0

Bedingungen: T_M: 1 μM Sonde und 1 μM **akt-RNA** in PBS-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7); Fluoreszenz: 1 μM Sonde und 5 μM **akt-RNA** bei Zugabe in PBS-Puffer, λ(ex) = 485 nm, λ(em) = 535 nm, slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Die Fluoreszenzerhöhung ist jedoch unabhängig von der Beeinflussung der Duplexstabilität. So zeigte **β-cRib** mit I/I₀ = 11.7 die maximale Fluoreszenzerhöhung (**akt-TO-04**), während der Maximalwert mit **α-cRib** bei I/I₀ = 2.2 (auf derselben Position) liegt. Ebenfalls für **Ser(TO)** erbrachte diese Position die größte Fluoreszenzerhöhung (I/I₀ = 6.9). Betrachtet man alle weiteren TO-Positionen dieses Sequenzausschnitts, so erwies sich **α-cRib(TO)** als quasi nicht-responsiv bezüglich Hybridisierung mit komplementärer RNA. Im Fall von **β-cRib(TO)** gab es eine einzige leistungsstarke Sonde, während die übrigen sehr geringe Performance erbrachten. Im Gegensatz dazu zeigte **Ser(TO)** auf fünf der zehn Positionen eine Responsivität von I/I₀ > 4. Exemplarische Fluoreszenzspektren zum Vergleich des Anbindungsmodus sind im Anhang gezeigt (Abb. 9.1.1). Ein möglicher Grund für die meist geringen Fluoreszenzanstiege des Carbozyklus ist die Abwesenheit des endozyklischen Sauerstoffs, wodurch im Gegensatz zu natürlichen Nukleosiden keine bevorzugte Konformation des Fünfrings erhalten wird. Daraus resultiert eine gewisse Flexibilität, die offenbar nur in Ausnahmefällen eine starke Hinderung der Rotation um die Methinbrücke und somit eine starke Zunahme der Fluoreszenzemission bewirkt. Überträgt man die Ergebnisse der TO-Positionierung auf eine unbekannte Sequenz, so sollte die Zuverlässigkeit der Fluoreszenzerhöhung von **Ser(TO)** das Auffinden geeigneter Sequenzkontexte für FIT-

Sonden deutlich vereinfachen, sodass **Ser(TO)** in zukünftigen Untersuchungen Verwendung fand.

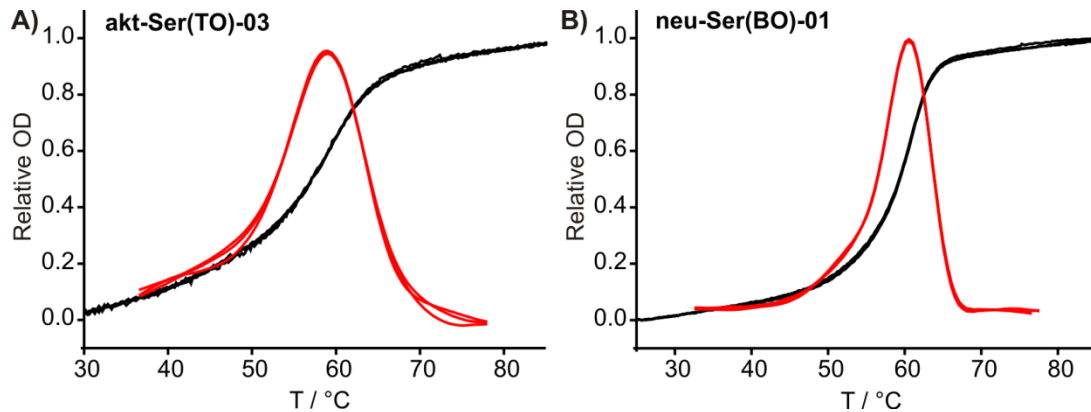


Abbildung 4.1.7: Exemplarische Schmelzkurven einer **Ser(TO)**- (A) und einer **Ser(BO)**-markierten Sonde (B). Die schwarzen Linien geben die Hyperchromizität bei 260 nm an (OD = optische Dichte); die roten Linien ergeben sich aus der jeweils ersten Ableitung der Absorptionskurven, dabei geben die Maxima die Schmelztemperatur an.

Die drei untersuchten BO-Nukleosidanaloga zeigten im Allgemeinen keine signifikanten Unterschiede in der Duplexstabilität (Tabelle 4.1.2). Der Hybridisierungs-induzierte Fluoreszenzanstieg fiel deutlich geringer aus als für die β -Aktin-TO-Sonden. Die verminderte Responsivität von BO wurde bereits in PNA-FIT-Sonden festgestellt.^[191] Im Vergleich der Anbindungsmodi zeigte **β -cRib(BO)** Maximalwerte von lediglich 2.3-2.6 (**neu-cRib(BO)-02** und **-10**), während die übrigen Sonden schwach responsiv waren oder häufig sogar ein verringertes Fluoreszenzsignal bei Hybridisierung ergaben. Im Gegensatz zu TO zeigte die Anbindung von BO mittels **α -cRib** stets verbesserte Fluoreszenzintensivierungen als die Verknüpfung durch **β -cRib**, wenngleich nur eine einzige Sonde $I/I_0 > 3$ erreichte (**neu- α -cRib(BO)-10**). **Ser(BO)** erbrachte immerhin auf drei Positionen $I/I_0 > 3$, mit einem Maximalwert von $I/I_0 = 5.6$ und empfiehlt sich somit auch für BO als bevorzugten Anbindungsmodus. Exemplarische Fluoreszenzspektren zum Vergleich der Anbindung von BO sind im Anhang gezeigt (Abb. 9.1.2).

Tabelle 4.1.2: Vergleich verschiedener Anbindungsmodi für BO.

neu-	Sequenz, X = Linker(BO)	β-cRib(BO)		α-cRib(BO)		Ser(BO)	
		$T_M / ^\circ\text{C}$	I/I_0	$T_M / ^\circ\text{C}$	I/I_0	$T_M / ^\circ\text{C}$	I/I_0
BO-01	GGTTTCAGT Y ATTATGCCGTTGTATTT	62	0.6	63	1.1	61	1.1
BO-02	GGTTTCAGTT Y TTATGCCGTTGTATTT	63	2.6	62	2.8	61	3.2
BO-03	GGTTTCAGTTA Y TATGCCGTTGTATTT	61	0.6	62	1.0	61	1.1
BO-04	GGTTTCAGTTAT Y ATGCCGTTGTATTT	61	0.4	62	0.5	62	0.6
BO-05	GGTTTCAGTTATT Y TGCCGTTGTATTT	63	1.0	63	2.0	62	1.5
BO-06	GGTTTCAGTTATTA Y GCCGTTGTATTT	62	0.5	61	0.6	61	0.6
BO-07	GGTTTCAGTTATTAT Y CCGTTGTATTT	59	0.2	58	0.9	57	1.4
BO-08	GGTTTCAGTTATTATG Y CGTTGTATTT	58	1.4	57	1.8	58	5.6
BO-09	GGTTTCAGTTATTATGC Y GTTGTATTT	60	1.4	61	2.2	59	1.3
BO-10	GGTTTCAGTTATTATGCC Y TTGTATTT	60	2.3	59	3.5	59	3.4

Bedingungen: T_M : 1 μM Sonde und 1 μM **neu-RNA** in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7); Fluoreszenz: 1 μM Sonde und 5 μM **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$, slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 $^\circ\text{C}$.

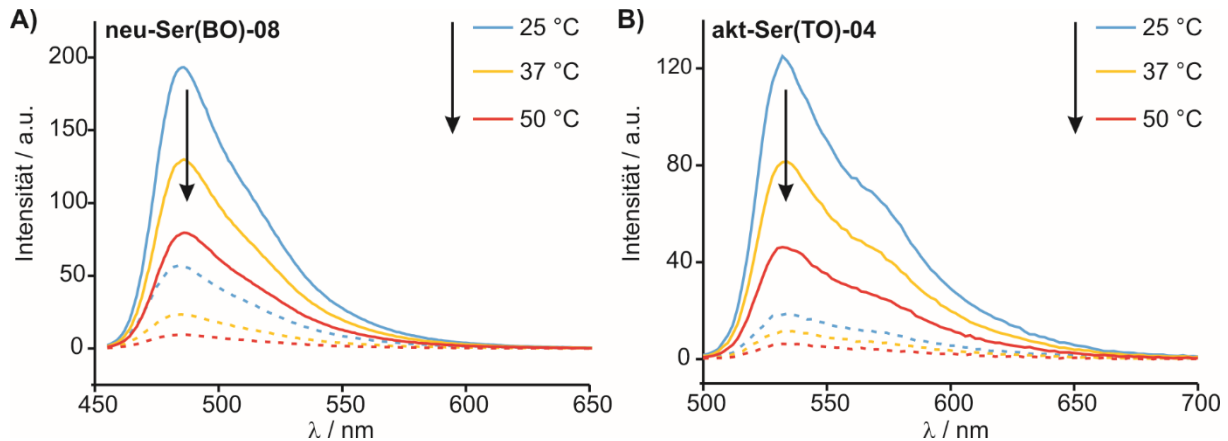


Abbildung 4.1.8: Temperaturabhängige Fluoreszenzemission von BO- und TO-Sonden vor (gestrichelte Linien) und nach der Zugabe komplementärer RNA (durchgehende Linien) bei der jeweils angegebenen Temperatur; Bedingungen siehe Tabelle 4.1.1 bzw. 4.1.2.

Beide Farbstoffe zeigten unabhängig vom gewählten Anbindungsmodus eine dramatische Abhängigkeit der Emissionsintensität von der Temperatur. Dies war sowohl im Einzel- als auch im Doppelstrang zu beobachten. Die Zunahme der Temperatur bewirkt eine erhöhte Moleküldynamik, sodass die Rotation um die zentrale Methinbrücke erleichtert wird. Dabei verringert sich die Emission stärker im Einzel- als im Doppelstrang, sodass üblicherweise vergrößerte relative Fluoreszenzanstiege bei erhöhter Temperatur erhalten werden (siehe auch Anhang, Tabelle 8.1.1). Dieses Verhalten wurde unabhängig vom verwendeten Chromophor und Anbindungsmodus für alle Sonden beobachtet. Als groben Richtwert ließ sich eine Halbierung der Fluoreszenzemission beim Übergang von 25 °C zu 37 °C feststellen. Der Verlust der Emissionsintensität ist im Bereich der Schmelztemperatur am Größten, was ebenfalls durch temperaturabhängige Fluoreszenzemission (Fluoreszenzschmelzen) belegt werden kann (siehe Beispiele im Anhang, Abb. 9.1.3).

4.1.5 DNA und RNA-Detektion von *Influenza-H1N1*-Neuraminidase

Um die Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit des Sequenzkontexts weiter zu untersuchen, wurden **Ser(TO)**-Sonden für 15 Positionen der *Neuraminidase*-Sequenz hergestellt (**neu-TO-a** bis **neu-TO-o**, Tabelle 4.1.3). Neben der Detektion von RNA wurde ebenfalls die Verwendung von komplementärer DNA untersucht. Analog zu Experimenten mit PNA-Sonden sollte die erfolgreiche Sequenz-spezifische Detektion von DNA die Verwendung der Sonden in der Echtzeit-PCR ermöglichen.

Auch auf diesem Sequenzabschnitt zeigte sich **Ser(TO)** als äußerst zuverlässig. Bei zwölf der 15 Positionen war der Fluoreszenzanstieg mit RNA größer als Faktor $I/I_0 = 3$, wovon acht Sonden einen Anstieg von $I/I_0 > 5$ erzielten; eine Fluoreszenzintensivierung von $I/I_0 > 10$ wurde immerhin von einem Fünftel der Sonden erzielt. Somit bestätigte sich die Zuverlässigkeit von **Ser(TO)** in der RNA-Detektion. Die vollständigen Absorptions- und Emissionsspektren befinden sich im Anhang (Abb. 9.1.5). Im Vergleich fiel auf, dass die besten Positionen der BO-Sonden (**neu-02**, **-09** und **-10**) ebenfalls sehr gute **Ser(TO)**-Sonden ergaben. Als Konsequenz

der verringerten Fluoreszenzemission im Doppelstrang ist der Fluoreszenzanstieg bei Verwendung von DNA als Zielsequenz deutlich geringer.

Tabelle 4.1.3: Sequenzen und Fluoreszenzeigenschaften **Ser(TO)**-markierter Sonden gegen *Neuraminidase*-mRNA.

neu-TO-	Sequenz, X = Ser(TO)	I_0	RNA		DNA	
			I	I/I_0	I	I/I_0
a	GGTTTC X GTTATTATGCCGTTGTATTT	4.3	28.6	6.7	17.9	4.2
b	GGTTTC A TTATTATGCCGTTGTATTT	8.6	47.6	5.6	21.9	2.6
c	GGTTTCAG X TATTATGCCGTTGTATTT	5.6	68.0	12.2	19.1	3.4
d	GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	4.9	18.0	3.7	8.8	1.8
e	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	6.2	65.5	10.6	29.6	4.8
f	GGTTTCAGTT A TTATGCCGTTGTATTT	3.8	19.0	5.0	10.3	2.7
g	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	9.7	15.7	1.6	13.3	1.4
h	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8.6	54.0	6.2	17.5	2.0
i	GGTTTCAGTTATTA X GCCGTTGTATTT	7.6	10.8	1.4	6.6	0.9
j	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	13.5	42.4	3.2	11.6	0.9
k	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8.7	41.7	4.8	11.7	1.3
l	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	3.5	23.0	6.6	8.2	2.3
m	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	4.2	40.8	9.7	20.7	4.9
n	GGTTTCAGTTATTATGCCG X TGTATTT	4.4	52.4	12.0	19.6	4.5
o	GGTTTCAGTTATTATGCCGT X GTATTT	3.5	11.4	3.3	6.0	1.7

Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 5 Äq. **neu**-RNA bzw. Sequenzanaloge **neu**-DNA (AAATACAACGGCATAA TAACTGAAACC), bei Zugabe in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Nur ein Drittel der Sonden erreichte einen Anstieg von Faktor > 3 , der Maximalwert lag bei lediglich $I/I_0 = 4.9$ (**neu-TO-m**). Interessanterweise ergaben die besten Positionen bei Verwendung von RNA ebenfalls die besten Ergebnisse mit DNA als Zielsequenz. Es ist davon auszugehen, dass die Nukleobasen-Umgebung für DNA und RNA-Zielsequenzen einen ähnlichen Einfluss auf die Interkalation des Chromophors hat. Jedoch bedingt die veränderte Duplexgeometrie unterschiedliche Rotationsfreiheitsgrade für das interkalierte Chromophor. Auch wenn eine strukturelle Untersuchung bisher aussteht, ist anzunehmen, dass der vergrößerte longitudinale Abstand der Nukleobasen bei DNA-DNA Duplexen (3.3 Å) im Vergleich zu DNA-RNA-Duplexen (2.9 Å) verstärkt Rotation um die Methinbrücke erlaubt, woraus eine verringerte Fluoreszenzemission resultiert.

4.1.6 DNA-FIT-Sonden in der Echtzeit-PCR

Um DNA-FIT-Sonden in der Echtzeit-PCR verwenden zu können, sollte ein Fluoreszenzanstieg von $I/I_0 \approx 5$ (bei 37 °C) ausreichend sein, da zum einen das Hintergrundsignal subtrahiert wird, zum anderen erhöhte Fluoreszenzanstiege bei der Anlagerungstemperatur (typischerweise $> 50 \text{ °C}$) erzielt werden sollten. Da DNA enzymatisch prozessiert werden kann, würde eine DNA-FIT Sonde ebenfalls als Primer in der PCR fungieren und somit am 3'-Ende verlängert werden. Umgekehrt würde die reverse Elongation an der Stelle des Chromophors abbrechen, sodass das Chromophor nicht im Duplex liegt und keine bzw. nur geringen Fluoreszenzanstieg zeigen würde. Um die Elongation der Sonde zu verhindern wurde die 3'-OH-Gruppe durch eine Propan-1,3-diol-phosphat-Einheit blockiert, welches durch kommerziell erhältliche Hydroxypropyl-(HP)-CPGs gelang.

4.1. Vergleich der Anbindung von TO über Serinol und Carbozyklus

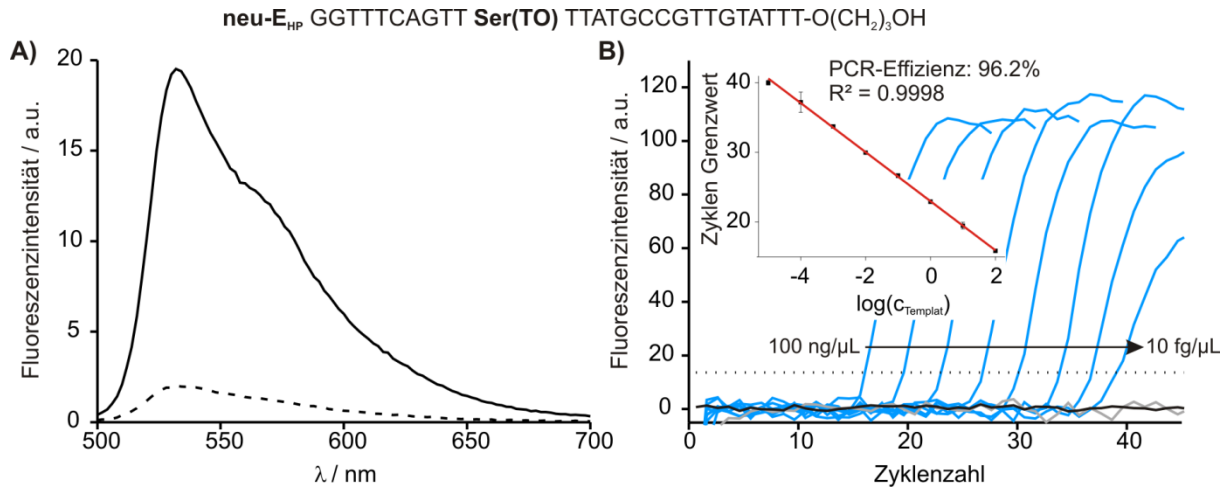


Abbildung 4.1.9: A) Fluoreszenzemission von **neu-E_{HP}** in PBS vor (gestrichelt) und nach (durchgehend) Zugabe komplementärer DNA. Bedingungen: 1 μM Sonde und 5 μM Ziel-DNA bei Zugabe, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{--}700 \text{ nm}$ slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, 57.5 °C. B) **neu-E_{HP}** in der quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse (FAM-FIT) von cDNA (100 ng/μL – 10 fg/μL, blaue Linien) aus H1N1-infizierten MDCK-Zellen, Templat-freie Kontrolle (schwarze Linie) und cDNA (10 ng/μL, graue Linie) von nicht-infizierten Zellen. Die gepunktete Linie zeigt den Grenzwert, welcher zur Bestimmung der PCR-Effizienz (siehe Einschub) verwendet wurde.

Mit Hilfe der Sonde **neu-E_{HP}** und cDNA, welche aus H1N1-infizierten MDCK-Zellen erhalten wurde, konnte die Echtzeitdetektion von *Neuraminidase* problemlos demonstriert werden. Bei der Anlagerungstemperatur von 57.5 °C zeigte die Sonde **neu-E_{HP}** einen Anstieg von Faktor 10 mit komplementärer DNA (Abb. 4.1.9A). Die cDNA wurde freundlicherweise von Matthias Schade (Arbeitsgruppe Prof. Hermann, HU-Berlin) bereitgestellt. Ein konventionelles PCR-Setup unter Verwendung von spezifischen *Primern* für *Neuraminidase* (experimentelle Details siehe Kapitel 6.2) und Auslesung der TO-Emission mittels Fluorescein-Filter ermöglichten eine hocheffiziente PCR (Effizienz = 96.2%) über einen linearen Bereich von mindestens acht Größenordnungen (von 100 ng/μL bis 10 fg/μL cDNA, blaue Kurven Abb. 4.9). In Abwesenheit von cDNA oder bei Verwendung von cDNA nicht-infizierter Zellen wurde hingegen kein Signalanstieg festgestellt (schwarze bzw. graue Linie). Im Gegensatz zu sequenzspezifischen Hybridisierungssonden zeigen unspezifischen Detektionsmethoden für doppelsträngige DNA, wie z.B. SYBR®-Gold, auch die *Primer*-Dimerisierung in späten Phasen der PCR (> 35 Zyklen) an (siehe Anhang, Abb. 9.1.4). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich DNA-FIT-Sonden zur effizienten, sequenzspezifischen Echtzeit-PCR eignen.

4.1.7 Vermeidung falsch-positiver Signale durch DNA-FIT-Sonden

Nicht nur in der PCR sondern ebenfalls in zellulärer Umgebung lassen sich DNA-basierte Sonden enzymatisch prozessieren. Neben dem Abbau der Sonde durch *DNasen* oder der Ziel-RNA durch *RNase-H*, könnte allein die Anwesenheit von zellulären Bestandteilen wie z.B. Proteinen, Membranbestandteilen sowie weiteren Nukleinsäuren zu unspezifischen Signalanstiegen führen. Solch unspezifische Signale wurden in der Vergangenheit für *Molecular Beacons* beschrieben.^[142] Der Abbau von DNA mittels *DNase-I* führt zur unspezifischen Fragmentierung in Di- und Trinukleotide und somit bei MBs zur Spaltung der Stamm- und Hybridisierungssequenz, was unweigerlich in der räumlichen Trennung von

Chromophor und *Quencher* und somit in einem Fluoreszenzanstieg resultiert (Abb. 4.10A-A'). Allein die Anwesenheit von Zelllysats zeigte durch unspezifische Bindung eine Abschwächung der Fluoreszenzlöschung (schwarze Kurve Abb. 4.1.10A), wodurch die Responsivität bei Hybridisierung mit komplementärer RNA verringert wurde. Der vollständige Verdau des MBs resultierte in ein Fluoreszenzsignal, welches nur unwesentlich geringer ausfiel als das spezifische Signal des intakten MB (Abb. 4.1.10A').

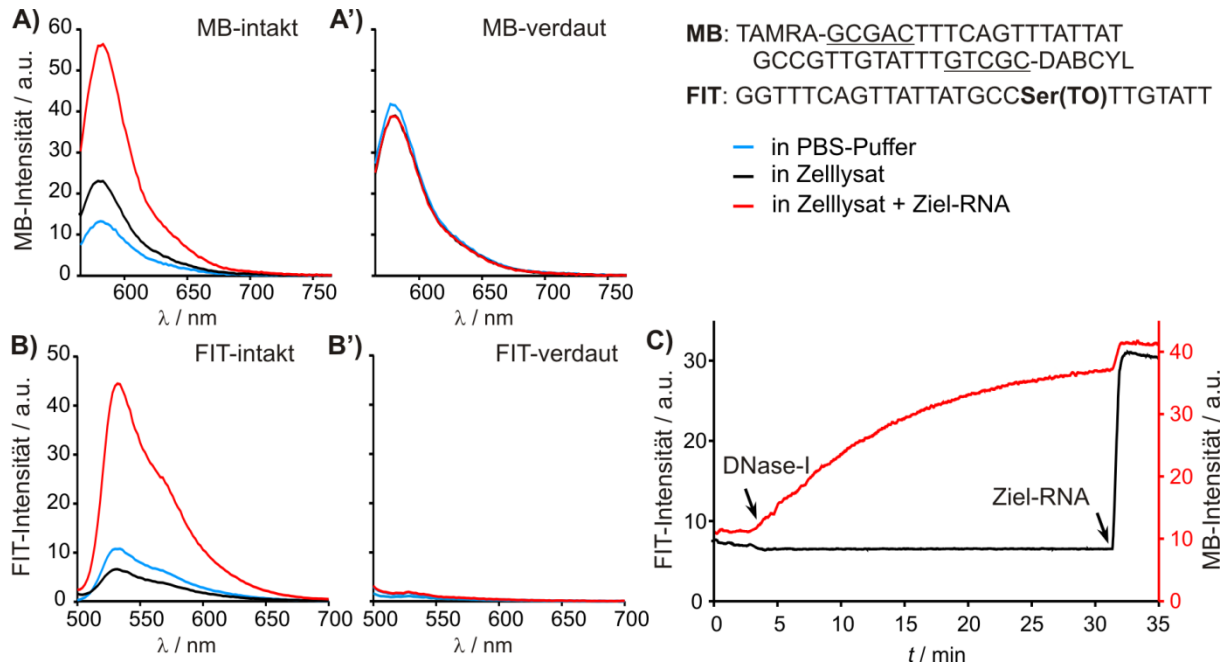


Abbildung 4.1.10. A-B) Fluoreszenzemission des Molecular Beacons (MB) (A+A') und der FIT-Sonde (**neu-M**) (B+B') in PBS (blau), in Zelllysats von (10^5 MDCK-Zellen/mL, schwarz) und nach Zugabe von RNA-Target in Zelllysats (rot) für intakte Sonden (A und B) sowie nach Verdau (A' und B') mittels *DNase-I* (0.44 mg/mL für 1 h bei 37°C). C) Zeitabhängige Fluoreszenz von FIT Sonde und MB in PBS-Puffer bei Zugabe von *DNase-I* (0.05 mg/mL bei 3 min) und Ziel-RNA (bei 31 min). Bedingungen: 0.1 μ M Sonde in PBS, 5 Äq. RNA bei Zugabe, 37 °C, FIT: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 535$ nm; MB: $\lambda(\text{ex}) = 540$ nm, $\lambda(\text{em}) = 580$ nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

Im Gegensatz dazu basieren FIT-Sonden auf der Änderung der Rotationsfreiheitsgrade im jeweiligen Chromophor, sodass keine falsch-positiven Signale zu erwarten waren. In Zelllysats zeigte die FIT-Sonde **neu-TO-m** verringerte Fluoreszenzemission, jedoch unveränderte Responsivität bei Zugabe von komplementärer RNA (Abb. 4.1.10B). Der Verdau mittels *DNase-I* zeigt den nahezu vollständigen Verlust der Fluoreszenz, sodass kein falsch-positives Signal auftreten konnte (Abb. 4.1.10B'). Zu beachten ist dabei, dass freier TO-Farbstoff in DNA interkalieren kann, was mit einer Fluoreszenzerhöhung einhergehen würde.^[188] In dieser Untersuchungen erlaubten die TO-tragenden Oligonukleotidfragmente hingegen keine Interkalation in den Duplex, sodass kein unspezifisches Signal in Anwesenheit von zellulärer RNA und DNA im Lysat hervorgerufen wurde (Abb. 4.10B').

4.1.8 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenzanstieg für BO- und TO-basierte FIT-Sonden stark von der Sequenzumgebung sowie dem Anbindungsmodus abhängt. Dabei führt die pseudo-bio-isostere Anbindung von TO durch das carbozyklische Nukleosidanalogue β -

cRib(TO) dem azyklischen **Ser(TO)** nur auf einer einzigen Position (**act-TO-04**) zu einem größeren Fluoreszenzanstieg. In allen weiteren untersuchten Sonden zeichnete sich **Ser(TO)** durch eine höhere Toleranz hinsichtlich der Sequenzumgebung in FIT-Sonden aus und erzielte bis zu 12-fache Fluoreszenzanstiege.^[211] Vorhergehende Untersuchungen mit FIT-PNA zeigten, dass ein Fluoreszenzanstieg von Faktor 3.4 bereits ausreichend für die Lebendzell-Bildgebung von viraler mRNA ist. **Ser(TO)** zeigte diese Mindestanforderung ($I/I_0 > 4$) bei 15 der insgesamt 25 untersuchten Positionen. Ebenfalls bei BO-markierten Sonden generierte Serinol größere Fluoreszenzanstiege als der Carbozyklus. Dennoch erwies sich das Auffinden von responsiven Positionen für BO als vergleichsweise aufwendig. Die Duplexstabilität wurde durch den Einbau der FIT-Reporter nur unwesentlich beeinträchtigt. Obwohl das Ansprechverhalten der Sonden bei Verwendung von DNA als komplementärer Sequenz deutlich vermindert ist, konnten **Ser(TO)**-basierte Sonden zur effizienten Detektion von DNA in der Echtzeit-PCR verwendet werden. Im Vergleich zu DNA-basierten *Molecular Beacons* zeichnet sich FIT-DNA durch die Vermeidung von unspezifischen, falsch-positiven Signalen vor biologischem Hintergrund und bei Nukleaseverdau aus. Aufgrund der überlegenen Fluoreszenzeigenschaften und der einfacheren Synthese wurde in den folgenden Untersuchungen stets das Serinolrückgrat verwendet.

4.2 6-Hydroxychinolin als umgebungssensitives Nukleobasensurrogat

Die Erfahrungen zur Anbindung von Nukleobasensurrogaten, welche nicht durch eine glykosidische Bindung verknüpft werden können, wurden zur Darstellung eines 6-Hydroxychinolin-modifizierten Nukleosidanalogs genutzt. Das *N*-alkylierte 6-Hydroxychinolinium (6HC) besitzt hochinteressante spektroskopische Eigenschaften: Durch die stark ausgeprägte Solvatochromie und die dramatische Änderung des Dipolmoments bei Anregung bzw. Relaxation, eignet sich dieses Chromophor hervorragend für die Ultrakurzzeit-Spektroskopie im Terrahertzbereich, wodurch indirekt auf Schwingungs-Spektren umgebender Wassermoleküle sowie Wasserstoffbrückenbindungen geschlossen werden kann. Diese spektroskopischen Methoden wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ernsting (Physikalische Chemie, HU-Berlin) etabliert und konnten bereits an anderen 6HC-Konjugaten demonstriert werden.^[212] Mit dem Einbau dieses Chromophors in den DNA-Basenstapel werden Messungen zur Dynamik der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Duplex bzw. beim Übergang von Einzelstrang zu Doppelstrang ermöglicht. Solch ein „molekulares Spektrometer“ könnte wertvolle Informationen über Hybridisierungsvorgänge von Nukleinsäuren bei der DNA-Replikation, der Transkription aber auch bei Reparaturmechanismen liefern.

4.2.1 Synthese eines artifiziellen 6HC-Nukleosids

In vorhergehenden Arbeiten von Dr. Lucas Bethge wurde die Synthese des carbozyklischen 6HC-Nukleosids **cRib(6HC)**, analog zur Synthese der carbozyklisch verknüpften TO-Konjugate, erarbeitet. Dabei zeigte die Verknüpfung von 6-Hydroxychinolin mit dem carbozyklischen Vorläufer mittels nukleophiler Substitution des Mesylats (**22**; vgl. Abb 4.1.4) sehr schlechte Ausbeuten und Diastereoselektivität. Zwar gelang die Darstellung des Zielmoleküls (**29α/β**), jedoch wurde nach Anfertigung des Phosphoramidites und dessen Verwendung in der DNA-Synthese keine 6HC-markierte DNA erhalten, weshalb die Synthesestrategie verworfen wurde.

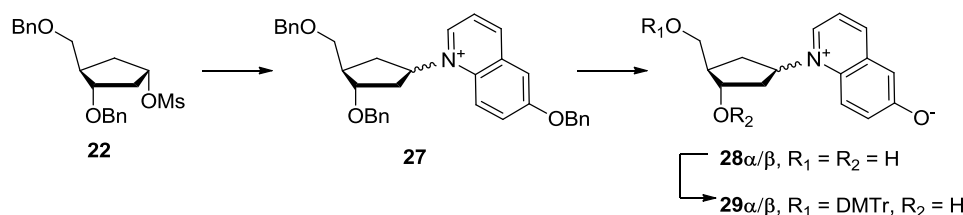


Abbildung 6.2.2. Schematische Darstellung der Synthesestrategie von **cRib(6HC)** nach Bethge.^[199]

Alternativ wurde die Synthese des Serinol-modifizierten 6-Hydroxychinolins (**Ser(6HC)**, **31a-c**) untersucht. Basierend auf Arbeiten von Dipl. Chem. Inga Pfeffer (Arbeitsgruppen Seitz, Mahrwald, Ernsting, HU-Berlin) gab es Hinweise, dass die Verknüpfung von Serinol und carboxymethyliertem 6HC (**30a-c**) nicht das gewünschte Produkt lieferte.^[213]

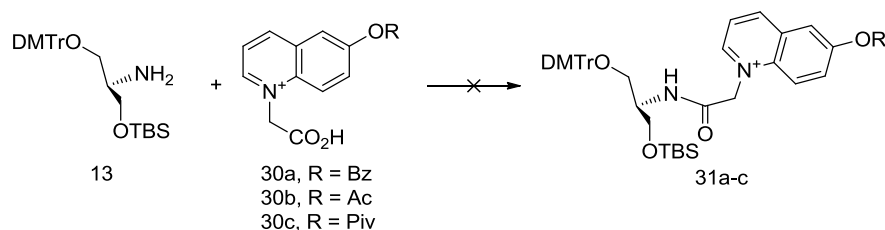


Abbildung 4.2.1: Schematische Darstellung der Versuche zur Synthese von Serinol(6HC).

In orientierenden Versuchen wurden verschiedene Schutzgruppen für die 6-Hydroxy-Position sowie unterschiedliche Kupplungsbedingungen zur Verknüpfung beider Fragmente untersucht. Dabei wurden stets geringe Ausbeuten bei gleichzeitigem Verlust der Schutzgruppe des Hydroxychinolins beobachtet. Ebenfalls indizierte die Analyse der Reaktionen mittels HPLC-RP-UV-MS die Fragmentierung des Zielmoleküls bzw. der Ausgangsstoffe in Produkt ohne Schutzgruppe auf der 6-Hydroxy-Position bzw. in nicht-alkyliertes 6-Hydroxychinolin mit und ohne Schutzgruppe, weswegen diese Strategie ebenfalls verworfen wurde.

Aufgrund der unerwartet großen Probleme zur Darstellung von 6HC-Konjugaten wurde das Glycerol-Rückgrat als alternativer Anbindungsmodus ausgewählt (**Gly(6HC)**, **36**). Glycerol bietet gegenüber den vorherigen Versuchen zahlreiche Vorteile: 1) Die Synthese erfolgt in wenigen Stufen; 2) die Anzahl an funktionellen Gruppen ist sehr überschaubar; 3) das einzige Stereozentrum wird durch das relativ kostengünstige Startmaterial (*S*-Glycidol, **33**) vorgegeben; 3) die Anbindung des 6HC durch Alkylierung verspricht eine hohe Stabilität gegenüber den Bedingungen der DNA-Synthese, Abspaltung und Reinigung. Auch wenn dieser Anbindungsmodus sowohl im Abstand der Sauerstoffatome zueinander als auch im Abstand des Rückgrats zum Nukleobasen-Surrogat jeweils um eine Bindung verkürzt ist, wurde für Glycerol-modifizierte DNA berichtet, dass sie stabile Duplexe mit komplementären Nukleinsäuren ausbildet (siehe Kapitel 2.2).

Das 6HC (**31**) wurde zunächst in den besonders stabilen Allylether **32** überführt. *S*-Glycidol (**33**) wurde an der freien Hydroxygruppe mittels DMTr-Cl blockiert (**34**). Die Öffnung des Epoxids erfolgte in Anwesenheit der Lewis-Säure BF_3 -Etherat. Jedoch führte die Lewis-Säure zur partiellen Abspaltung der DMTr-Gruppe, wodurch die Ausbeute verringert wurde. Das Produkt **35** wurde anschließend in das Phosphoramidit **36** überführt, per Flashchromatographie gereinigt und in der DNA-Synthese eingesetzt.

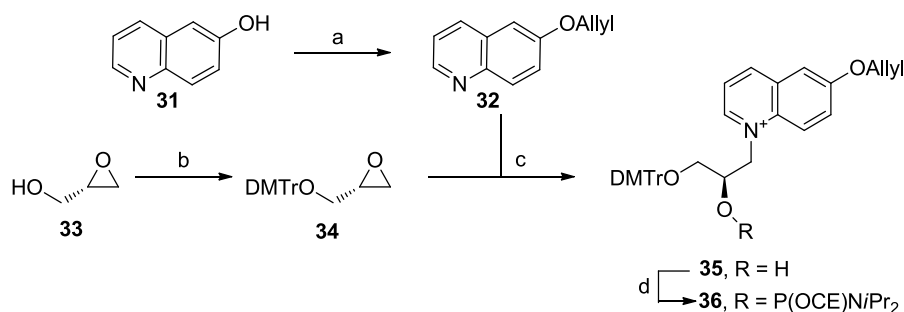


Abbildung 4.2.2: Synthese von Glycerol(6HC); a) Allylbromid, NaH, THF, 83%; b) DMTrCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 , quant.; c) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 30%; d) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Et_2NiPr , CH_2Cl_2 , 62%.

Die DNA-Synthese wurde bei und durch freundliche Unterstützung der *Noxxon Pharma AG* (Berlin) in einem größeren Synthesemaßstab (240 μmol) durchgeführt. Das Glycerol-6HC wurde in die symmetrische 13mer-Sequenz (**6HC-DNA**: GCTGCA Gly(6-HQ) ACGTCG) eingebaut und zeigte dabei eine hervorragende Kupplungsausbeute.

Vor der Abspaltung von der festen Phase wurde die Allylgruppe durch Behandlung mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und *N*-Methylanilin in THF entfernt. Die Abspaltung von der festen Phase erfolgte mittels Methylamin (40%, aq.) für eine Stunde bei 65 °C. Nach der Reinigung mittels HPLC-RP-UV (DMTr-on/off Strategie) wurde das Oligonukleotid in sehr hoher Reinheit erhalten (siehe Abb. 4.2.3C).

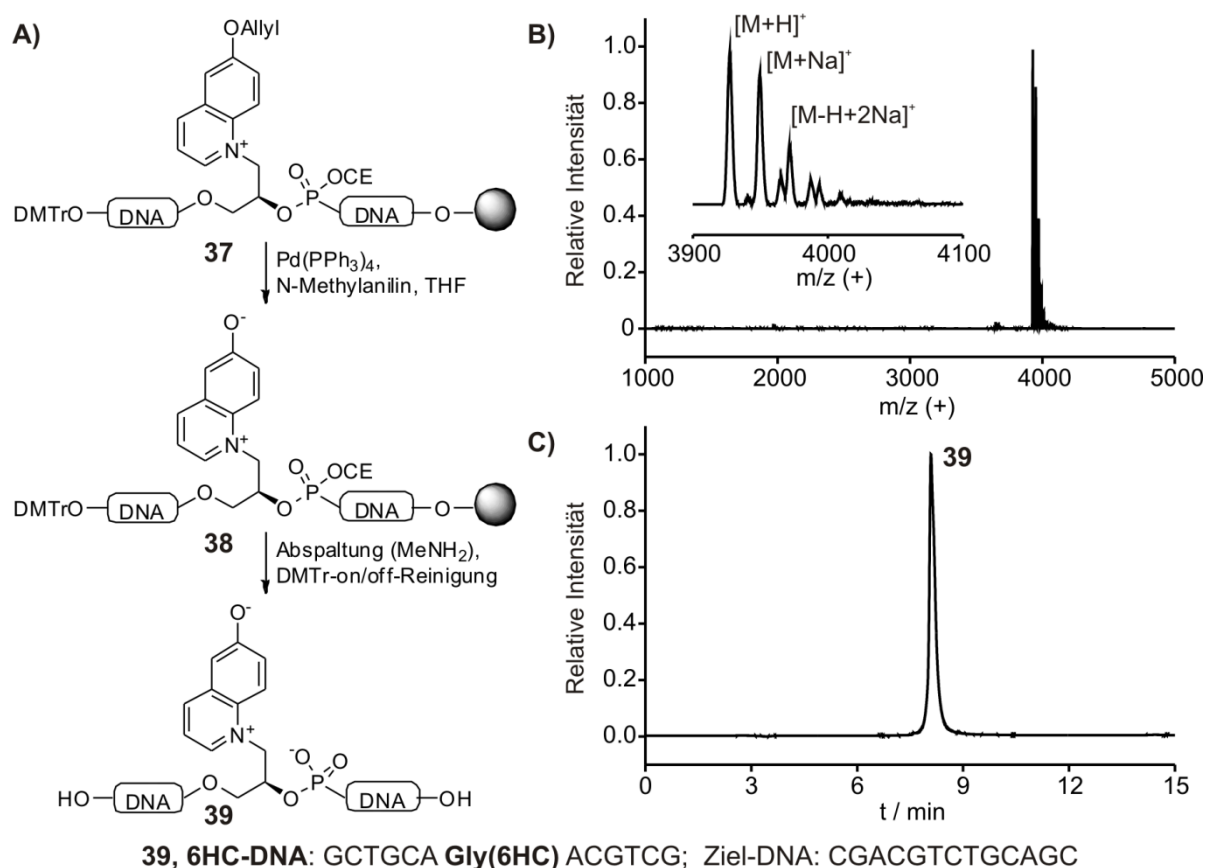


Abbildung 4.2.3: A) Abspaltungs- und Reinigungsprozedur der **6HC-DNA**; B) MALDI-TOF-MS des gereinigten Produkts sowie C) analytische HPLC-RP-UV (260 nm).

4.2.2 NMR-Strukturanalyse des 6HC-modifizierten DNA-Duplex in Lösung

Die dargestellte, 6HC-modifizierte DNA **39** wurde mit der Ziel-DNA (siehe Abb. 4.2.3) hybridisiert und der NMR-Strukturanalyse unterzogen. Die Messungen, Auswertungen und Berechnungen zur NMR-Struktur wurden von Dipl. Chem. Lars Dehmel (Arbeitsgruppe Prof. Ernsting, HU-Berlin) durchgeführt. Die Ergebnisse sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden, um einen Überblick über die Eignung von Glycerol als Anbindungsmodus für 6HC zu erhalten, sowie die Lage des Chromophors im Duplex zu charakterisieren.

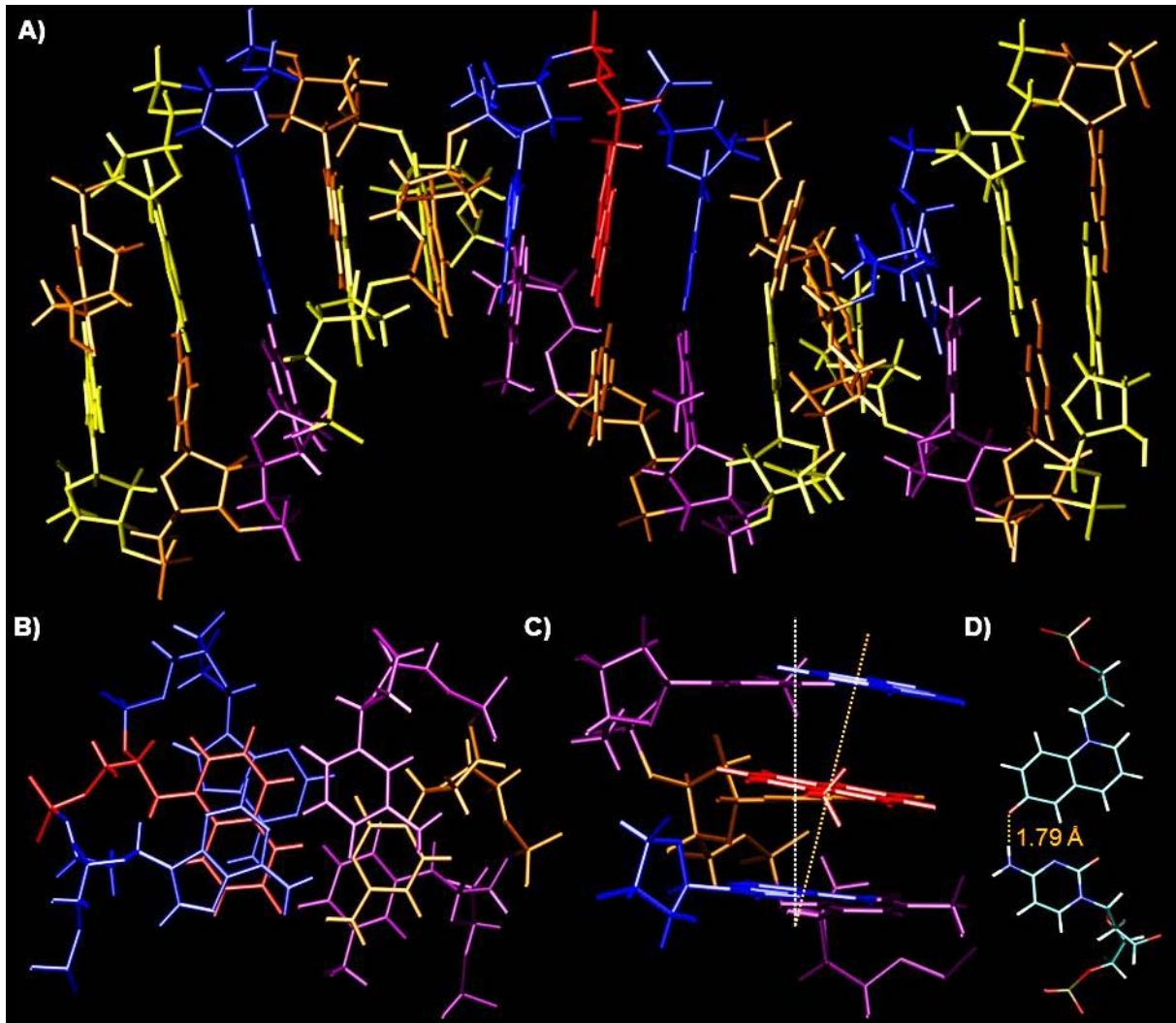


Abbildung 4.2.4: A) NMR-Struktur als Mittel der zehn energetisch niedrigsten Strukturen; B) Projektion der Stapelwechselwirkung des 6HC mit den benachbarten Adeninen; C) Lage der Helixachse (orange) im Vergleich zum optimalen B-DNA-Duplex (weiß); D) Wasserstoffbrückenbindung zwischen 6HC und dem gegenüberliegenden Cytidin. Farbkodierung: Orange: dC, gelb: dG, blau: dA, lila: dT, rot: Gly(6HC).

Zur Bestimmung der NMR-Struktur wurden die Abstände der Zucker und Nukleobasen durch räumliche Protonenkopplung (NOE, Kern-Overhauser-Effekt) sowie dipolare Restkopplungen (RDC, *residual dipolar coupling*) ermittelt. Anhand dieser Parameter wurde Computer-gestützt ein B-DNA-Duplex generiert und 100 Strukturen unter Berücksichtigung der ermittelten Parameter berechnet. Die Kombination der zehn energetisch günstigsten Strukturen ergab die gemittelte, dreidimensionale Struktur des 6HC-modifizierten Duplex (Abb. 4.2.4A). Gly(6HC) liegt im Basenstapel zwischen den benachbarten Adeninen (Abb. 4.2.4B), jedoch bedingt der verkürzte Anbindungsmodus eine leichte Beugung des Duplex, sodass eine Abweichung von der idealen Helix-Achse festzustellen war (Abb. 4.2.4C). Die deprotonierte Hydroxygruppe des 6HC befindet sich in einem Abstand von 1.79 Å zur Aminogruppe des gegenüberliegenden Cytidins, sodass auf eine Wasserstoffbrückenbindung und somit auf eine artifizielle Basenpaarung geschlossen werden kann (Abb. 4.2.4D). Somit konnte erstmals 6HC in den Basenstapel eines DNA-Duplex gebracht werden, ohne dramatische Störungen der Struktur zu verursachen. Wenngleich die Verwendung von

Glycerol keine perfekte B-DNA-Helix lieferte, wurde durch Basenstapelwechselwirkungen und die Wasserstoffbrücke zum gegenüberliegenden Cytosin ein artifizielles Basenpaar erhalten.

4.2.3 UV-Vis-Absorption zur Analyse der 6HC-modifizierten DNA

Als Maß für den störenden Einfluss des **Gly(6HC)** wurde die Schmelztemperatur bestimmt (Abb. 4.2.5A). Diese liegt mit $T_M = 53\text{ °C}$ nur geringfügig (4 °C) unterhalb dem Wert, welcher für den unmodifizierten Doppelstrang berechnet wurde (57 °C).^[214, 215] Da davon auszugehen war, dass eine GC-Paarung deutlich stabiler als die 6HC-C Paarung ist, erscheint der negative Einfluss des Glycerol-Monomers sehr gering.

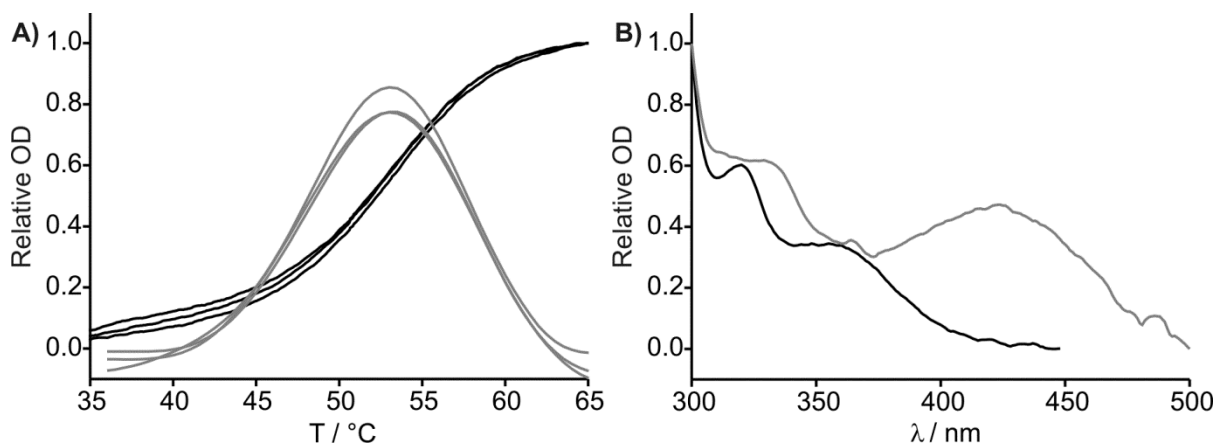


Abbildung 4.2.5: A) Schmelzkurven des 6HC-modifizierten DNA-Duplex (schwarz) sowie die jeweils erste Ableitung (grau). B) Absorptionsspektren der Sonde im Einzelstrang bei pH 7 (protoniert, schwarz) sowie nach Zugabe von 1% NH_3 (aq.) (deprotoniert, grau). Bedingungen: Schmelzkurve: $1\text{ }\mu\text{M}$ Sonde (**6HC-DNA**) und Ziel-DNA in PBS; Absorption: $1\text{ }\mu\text{M}$ Sonde (**6HC-DNA**) in PBS sowie 1%-Vol. NH_3 (32%, aq.) bei Zugabe, 25 °C .

Um die Solvatochromie des 6HC in DNA zu bestimmen, wurde in einem orientierenden Experiment der Einfluss des Protonierungsgrades der Sonde auf die Absorptionsbanden des 6HC untersucht. Aus Arbeiten der Gruppe um Prof. Ernsting war bekannt, dass die Deprotonierung des 6HC eine deutliche Rotverschiebung der Absorption bewirkt. Während die Sonde im Einzelstrang bei pH 7 in PBS-Puffer ein lokales Maximum bei 360 nm zeigte, führte die Zugabe von 1% Ammoniak (32%, aq.) zu einer Rotverschiebung von ca. 70 nm. Die weitere Zugabe von Ammoniak führte zu keiner weiteren Änderung der Absorptionsbande. Im Folgenden wurde überprüft, ob die deprotonierte, einzelsträngige Sonde ebenfalls durch Hybridisierung und Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zu Cytosin einen solvatochromen Effekt zeigt. Dazu wurden die Sonde allein sowie als DNA-Duplex in leicht basischem Milieu (pH 8.5) der Schmelzanalyse unter Aufnahme vollständiger Absorptionsspektren im Abstand von 5 °C im Bereich von $10\text{--}80\text{ °C}$ unterzogen.

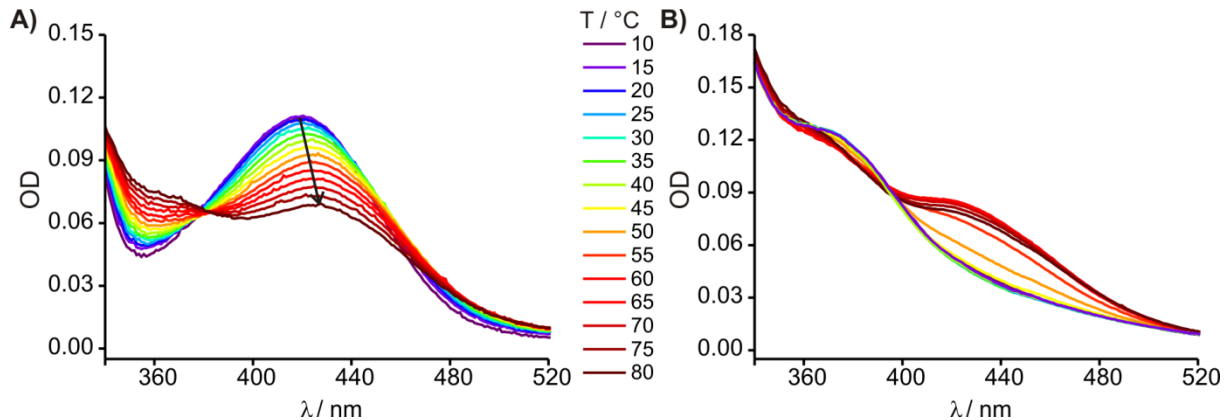


Abbildung 4.2.6: Absorptionsspektren der Sonde im Einzelstrang (A) sowie im Doppelstrang (B) bei der angegebenen Temperatur. Bedingungen: 131 μ M Sonde und ggf. Ziel DNA in Ammonium-Salzpuffer (150 mM NaCl, pH 8.5).

Die Absorptionsbande bei 260 nm bestätigt erneut das Schmelzen des Doppelstrangs, wie es bereits in der konventionellen Schmelzanalyse festgestellt wurde. Bei genauerer Betrachtung der Bande des 6HC (340-520 nm) konnte für den Sondeneinzelstrang ein lokales Minimum bei ca. 350 nm sowie ein Maximum bei ca. 420 nm festgestellt werden (Abb. 4.2.6A). Die Erhöhung der Temperatur bewirkte dabei ein Angleichen der beiden Banden sowie eine leichte Rotverschiebung (ca. 10 nm). Die grundsätzliche Kurvenform ähnelt jedoch stets dem Absorptionsspektrum der deprotonierten Sonden (siehe graue Linie Abb. 4.2.5B). Der Doppelstrang wies bei Temperaturen unterhalb des T_M (10-45 °C) trotz des leicht basischen Milieus einen Kurvenverlauf analog zum Absorptionsspektrum der protonierten Sonde auf (siehe schwarze Linie Abb. 4.2.5B), wodurch sich die Wasserstoffbrücke zwischen 6HC und Cytosin bestätigen ließ. Das thermische Denaturieren des Duplex bis zu 65 °C resultierte in einem deutlichen Anstieg der Absorptionsbande bei ca. 425 nm, während eine weitere Temperaturerhöhung ein Verhalten analog zur einzelsträngigen Sonde bewirkte (Abnahme der Absorption bei ca. 425 nm).

Eine eingehendere Betrachtung der Absorptionseigenschaften von Sonde und Duplex wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dipl. Chem. Lars Dehmel (Arbeitsgruppe Prof. Ernsting, HU-Berlin) unter Extrapolation von Absorptionsspektren von Einzel- bzw. Doppelstrang zu tieferen bzw. höheren Temperaturen diskutiert.

Die hier gezeigte Methode zum Einbau von nicht-natürlichen Nukleotiden in DNA ist nicht auf 6HC beschränkt, sondern sollte die Verwendung einer Vielzahl an Chromophoren erlauben. Trotz des relativ kurzen Anbindungsmodus wurde nur eine minimale Störung der Duplexstruktur hervorgerufen und artifizielle Basenpaarungen generiert. Durch „Chromophor-Basenpaarungen“ werden weitere spektroskopische Untersuchungen innerhalb des DNA-Duplex möglich und könnten ein Rückschluss auf die Duplexstruktur und die molekulare Erkennung zulassen.

4.3 Dual-markierte DNA-FIT-Sonden mit gesteigerter Helligkeit zur vereinfachten RNA-Detektion

Fluoreszente Hybridisierungssonden sind ein wichtiges Werkzeug zur sequenzspezifischen Detektion und Lokalisation von RNA in Zellen und Geweben. Neuere Entwicklungen in der quantitativen Echtzeit-PCR und der Sequenzierung erlauben zwar die Analyse kleinster Mengen von Nukleinsäuren, bis hin zur Einzelzell-PCR, jedoch können diese Methoden keine Aussage über die Lokalisation innerhalb der Zelle treffen, sodass für diese Fragestellungen unweigerlich Hybridisierungssonden benötigt werden. Zur Anwendung in Zellen müssen die Sonden zwei Schlüsselkriterien erfüllen: 1) starke Fluoreszenzerhöhung bei Hybridisierung, um gebundene von ungebundenen Sonden zu unterscheiden – besonders, wenn ungebundene Sondenmoleküle nicht vollständig durch Waschen entfernt werden können; 2) große Helligkeit des spezifischen Signals, um auch geringe Mengen RNA vor zellulärer Autofluoreszenz nachweisen zu können. Ziel dieser Untersuchung war es, einen Zugang zu responsiven FIT-Sonden mit deutlich vergrößerter Helligkeit zu finden.

Die Responsivität von FIT-Sonden wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt (Kapitel 4.1) diskutiert und **Ser(TO)** als optimaler Anbindungsmodus etabliert. Ein verringertes Hintergrundsignal und somit ein vergrößerter Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung kann durch Energietransferprozesse sowie durch Stoßlöschung erzielt werden. So konnten Socher *et al.* mit stammlosen PNA-Beacons Fluoreszenzverstärkungen von bis zu Faktor 450 erzielen.^[195] Bei anderen Hybridisierungssonden konnte durch die Verwendung von effizienteren *Quencher*-Molekülen, mehrerer *Quencher* sowie der Optimierung des Fluorophor-*Quencher*-Abstands die Responsivität extrem gesteigert werden.^[52, 216-218] Im Gegensatz dazu wurden der Sondenhelligkeit bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Eine detaillierte Untersuchung der Helligkeit verschiedener Sonden ist nur in wenigen Ausnahmen in der Literatur zu finden. Bei den meisten Sondenkonzepten bedingt effizientes *Quenching* ebenfalls ein verringertes maximales Signal im gebundenen Zustand, z.B. durch Restlöschung. Die Helligkeit, als Produkt des Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute, beschreibt die Aufnahme von Anregungsenergie und die Effizienz ihrer Umwandlung in Fluoreszenzemission. Beide Parameter hängen unter anderem von der Umgebung der Chromophore ab, z.B. von den benachbarten Nukleobasen bei der terminalen oder internen Anbindung von Chromophoren.^[188, 219] Auch wenn in diesen Fällen Raum für Optimierung zur Verfügung steht, kann bei der Verwendung eines einzelnen Chromophors nur eine geringfügige Verbesserung der Helligkeit erwartet werden. Vielversprechend erschien daher die Kombination mehrerer Chromophore. So sollte theoretisch durch die Verwendung von zwei TO-Reportern der Extinktionskoeffizient verdoppelt werden; bei unveränderter Quantenausbeute würde man dadurch eine Verdopplung der Helligkeit erwarten (siehe Abb.4.3.1). In Anlehnung an Untersuchungen zu PNA-basierten Sonden könnte ebenfalls die Responsivität der Sonden durch Aggregation mehrerer Farbstoffe im ungebundenen Zustand gesteigert werden.

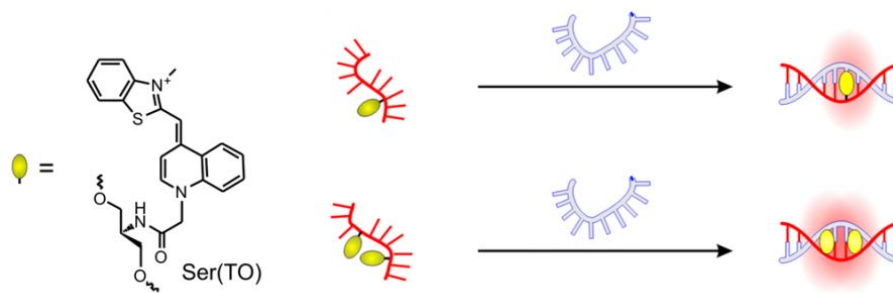


Abbildung 4.3.1: Konzept der mehrfach TO-markierten FIT-Sonden.

4.3.1 Mehrfach TO-markierte Sonden

Zunächst sollten die grundlegenden Eigenschaften mehrfach TO-markierter FIT-Sonden untersucht werden. Dazu wurden bis zu vier **Ser(TO)**-Einheiten innerhalb der vorher untersuchten *Neuraminidase*-Sequenz positioniert (Tabelle 4.2.1). Da die benachbarte Positionierung zweier Chromophore unweigerlich zur Aggregation in Einzel- und Doppelstrang führen würde, wurde jedes weitere Chromophor im Abstand von drei Nukleotiden eingefügt. Die ermittelten Daten der einfach-markierten Sonden (**neu-TO-a**, **-e**, **-i**, **-m**) ließen dabei den direkten Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zu. Die einfach-markierten Sonden (Tabelle 4.2.1) enthalten zwei sehr gute (**neu-TO-e**, **-m**), eine mittelmäßige (**neu-TO-a**) sowie eine schlechte Position (**neu-TO-i**) für **Ser(TO)**. Unabhängig von der Responsivität sollte ein additives Verhalten der einzelnen Chromophore in der stetigen Zunahme von Absorption und Emission resultieren.

Die Synthese mehrfach-markierter FIT-Sonden erfolgte analog zu einfach-markierten Sonden. Im Gegensatz zu PNA^[220] stellte der Einbau mehrerer Modifikationen, aufgrund der effizienten Phosphoramidit-Methode, keine besondere Herausforderung dar. Für die erfolgreiche Synthese musste lediglich eine hohe Kupplungsausbeute des **Ser(TO)**-Phosphoramidites sichergestellt werden, was durch die Erhöhung der TO-Phosphoramiditkonzentration (0.15 M anstatt 0.1 M) erzielt wurde.

Tabelle 4.3.1.1: Einfach und mehrfach intern TO-markierte *Neuraminidase*-Sonden.

neu	Sequenz, X = Ser(TO)	I_0	I	I/I_0
TO-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	4.3	28.6	6.7
TO-e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	6.2	65.5	10.6
TO-i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTATTT	7.6	10.8	1.4
TO-m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	4.2	40.8	9.7
TOTO-ae	GGTTTCXGTTXTTATGCCGTTGTATTT	3.2	49.7	15.4
TO³-aei	GGTTTCXGTTXTTAXGCCGTTGTATTT	4.9	43.0	8.8
TO⁴-aeim	GGTTTCXGTTXTTAXGCCXTTGTATTT	3.5	54.4	15.5

Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 2.5 μ M **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 535$ nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Durch den Einbau mehrerer Chromophore stieg die Absorption, jedoch wurde im Einzelstrang (schwarz gestrichelt, Abb. 4.2.2) durch Aggregation der TO-Einheiten eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 485 nm beobachtet. Dieses Verhalten deckt sich mit Untersuchungen zu Excimeren von Thiazolorange bzw. dem Homodimer „TOTO“.^[154] Die

Hybridisierung mit komplementärer RNA führte zum Auflösen der Aggregation, sodass ein für TO charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei ca. 515 nm sowie einer Schulter bei ca. 485 nm erhalten wurde (rot gestrichelt, Abb. 4.2.2). Durch die steigende Anzahl an TO-Einheiten wird sowohl der Extinktionskoeffizient gesteigert (bis zu 200.000 M·cm⁻¹ bei **neu-TO⁴-aeim**) als auch die Aggregation verstärkt. Letzteres führt, wie ebenfalls für H-Aggregate berichtet, zur Rotverschiebung der Emission, sodass im Einzelstrang das Maximum im Bereich von 595 nm liegt (schwarze Linien, Abb. 4.2.2).^[176] Die TO-Emission bei $\lambda(\text{em}) = 535$ nm war deutlich niedriger als die Summe der einfach TO-markierten Sonden (siehe Tabelle 4.2.1), wodurch sich das *Quenching* durch Aggregation bestätigen ließ.

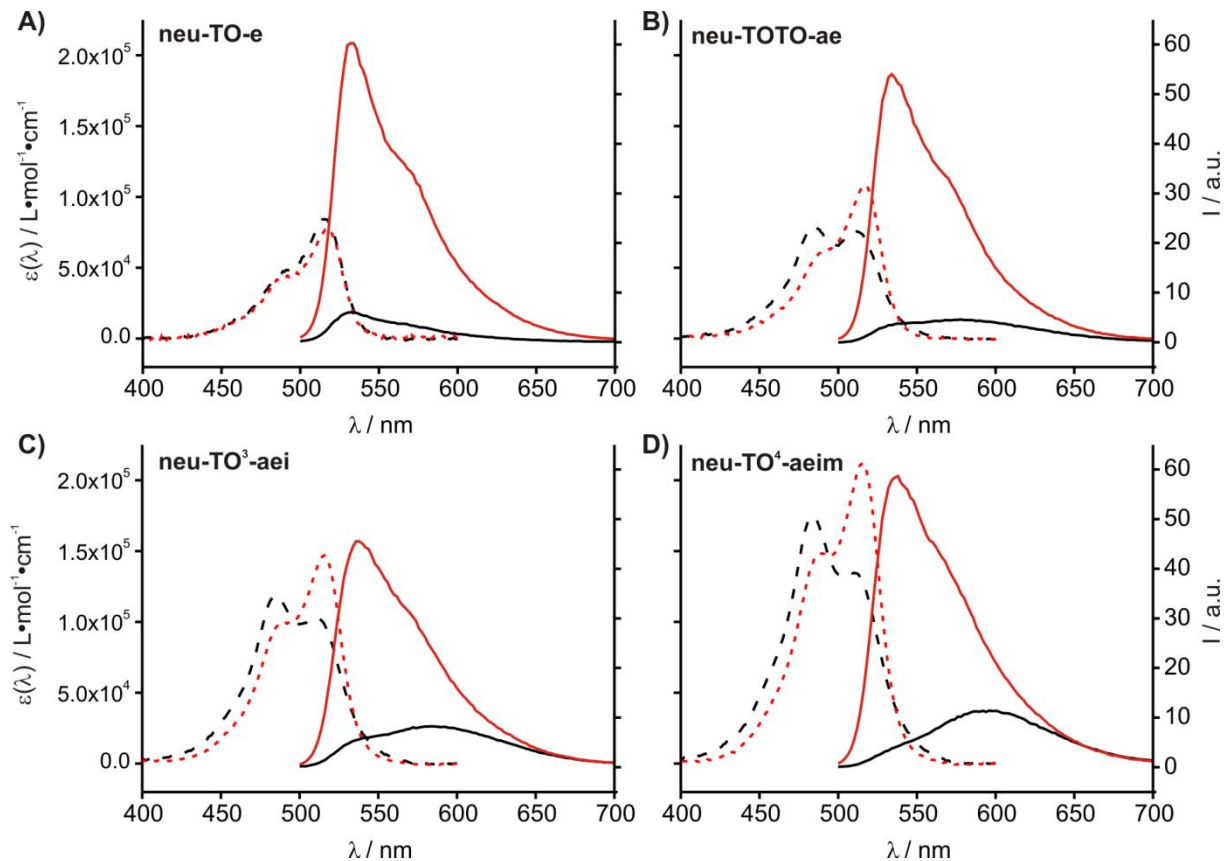


Abbildung 4.3.2: Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgehend) einfach- (A) und mehrfach-TO-markierter Sonden (B-D) in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit (rot) von komplementärer RNA. Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 2.5 μM **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700$ nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Bei Hybridisierung wurde jedoch keine vergrößerte Fluoreszenzemission durch den Einbau mehrerer TO-Einheiten erhalten (rote Linien). Die größte Fluoreszenzintensität wurde für die einfach-markierte Sonde **neu-TO-e** festgestellt, während der Einbau zusätzlicher Chromophore leicht verminderte Intensitäten bewirkt. Dies lässt den Rückschluss auf einen gegenseitigen Löschprozess (Selbst-*Quenching*) der Chromophore zu. Es ist davon auszugehen, dass der kurze Abstand zwischen den Chromophoren sowie die Überlappung von TO-Absorption und -Emission (siehe Abb. 4.2.2) den Energietransfer zwischen mehreren TO-Einheiten erlaubt. Die Delokalisation des angeregten Zustands über mehrere Chromophore vereinfacht die Entvölkerung des angeregten Zustands durch Löschprozesse.^[221] Beispielsweise könnte der Energietransfer von starken auf schwache TO-

Positionen zur verstärkten Entvölkerung des angeregten Zustands durch Rotation um die zentrale Methinbrücke die verminderte Fluoreszenzemission bedingen. Die von starken TO-Positionen aufgenommene Anregungsenergie würde über Energietransfer an schwächere Positionen weitergeleitet und damit wirksam den Entvölkerungsprozess des angeregten Zustands zugeführt werden.

4.3.2 Farbwechsel

Wenngleich mit dieser initialen Untersuchung das Ziel hellerer FIT-Sonden nicht erreicht werden konnte, so besitzen die mehrfach-markierten Sonden doch sehr interessante Fluoreszenzeigenschaften. Durch die aggregationsinduzierte Rotverschiebung des Emissionsmaximum um ca. 60 nm sowie der verminderten Fluoreszenz im Einzelstrang bei 535 nm ist es möglich, den Farbwechsel der Sonden bei Hybridisierung zu beobachten. Andere Sondenkonzepte, welche den Hybridisierungszustand durch Farbwechsel anzeigen, konnten bereits erfolgreich zur RNA-Detektion und zur Beobachtung der Integrität von *siRNA* verwendet werden.^[173-175] Auch wenn der Farbwechsel nicht das primäre Ziel dieser Arbeit war, so sollte dennoch die grundlegende Funktionalität eines solchen Konzepts untersucht werden. Dazu wurde die vierfach-markierte Sonde **neu-TO⁴-aeim** in einer 1-mL-Küvette vorgelegt (100 pmol/mL) und die Fluoreszenzemission bei Zugabe von komplementärer RNA in Schritten von 0.1 Äq. aufgezeichnet (Abb. 4.3.3A). Zusätzlich wurde die Emission bei Bestrahlung mittels einer UV-Lampe (5 Watt) beobachtet (Abb. 4.3.3C). Während in Abwesenheit von komplementärer RNA eine Emission im roten Bereich (ca. 600 nm) sogar bei Bestrahlung mit einer UV-Lampe erkennbar war, zeigte bereits die Zugabe von 0.1 Äq. RNA einen Farbwechsel zu Gelb. Es war also möglich mit mehrfach-markierten FIT-Sonden die Zugabe von 10 pmol RNA mit bloßem Auge zu verfolgen (Abb. 4.3.3A und C). Die weitere Zugabe von RNA führte zum vollständigen Auflösen der Aggregation, begleitet von einem starken Anstieg der Emission im grünen Bereich. Die Ratio der Emission im grünen (535 nm) und roten (595 nm) Bereich könnte zur Berechnung des Hybridisierungszustandes der Sonde verwendet werden (Abb. 4.3.3B).

Ebenfalls die Integrität des Sonden-Target-Duplex lässt sich mit Hilfe des Farbwechsels verfolgen. Dazu wurden Absorptionmessungen im Bereich von 220-620 nm bei ansteigender Temperatur durchgeführt (Abb. 4.3.4). Das Denaturieren des Duplex ist wiederum begleitet von der Aggregation der Chromophore, sodass bei ansteigender Temperatur das Maximum der Absorption von 515 nm hin zu 485 nm verschoben wurde. Experimente mit der zweifach- und der dreifach-markierten Sonde ließen ähnliche Beobachtungen zu. Auch wenn hier der Farbwechsel nicht tiefergehend untersucht wurde, so bietet mehrfache TO-Markierung einen vielversprechenden Ansatz zur Überprüfung des Hybridisierungszustandes der Sonde.

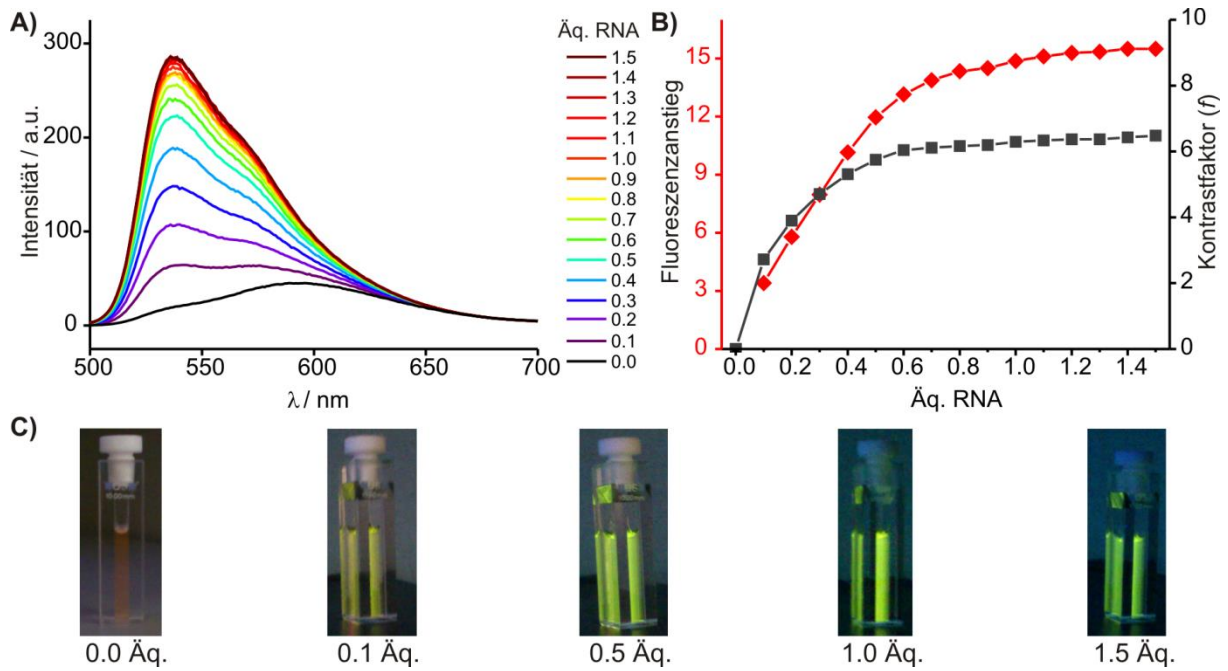


Abbildung 4.3.3: Farbwchsel der Sonde **neu-TO⁴-aeim** bei schrittweiser Zugabe von 0.1 Äq. **neu-RNA**. A) Emissionsspektren; B) Fluoreszenzerhöhung bei $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$ (rot) und Kontrastfaktor (f , schwarz) als Ratio $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm} / \lambda(\text{em}) = 595 \text{ nm}$; C) Fotos der Fluoreszenzküvetten bei Bestrahlung mittels einer 5 W-UV-Lampe. Bedingungen: 1.0 μM Sonde und 0.1-1.5 μM **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 10 nm, 37 °C.

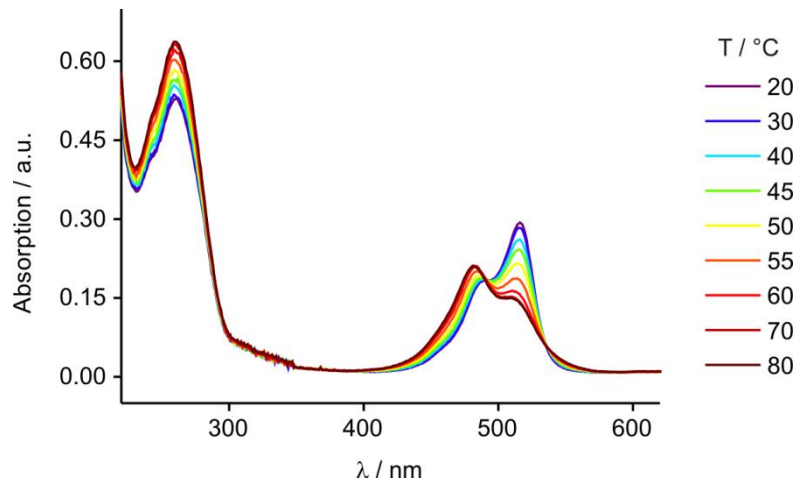


Abbildung 4.3.4: Absorption der Sonde **neu-TO⁴-aeim** in Anwesenheit von 1.0 Äq. komplementärer RNA bei Denaturierung des Duplex bei ansteigender Temperatur. Bedingungen: 0.5 μM Sonde und **neu-RNA** in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7).

4.3.3 TO-TO-Abstandsuntersuchung

Der Energieübertrag zwischen TO-Einheiten sollte wie jeder Energietransferprozess hauptsächlich von zwei Faktoren abhängen: dem Abstand und der Orientierung beider Reporter. Beides wird durch den Basenabstand und die damit einhergehende Drehung innerhalb der Helix vorgegeben. Zusätzlich war zu erwarten, dass die Kombination „starker“ TO-Positionen weniger Entvölkerung des angeregten Zustands durch Rotation um die zentrale Methinbrücke nach erfolgtem Energietransfer erfährt. Zur detaillierten Untersuchung des Abstands, der Orientierung und der gegenseitigen Löschung wurden die vormals untersuchten 15 **Ser(TO)**-Positionen des Sequenzabschnitts von *Influenza-H1N1-Neuraminidase*

4.3. Dual-markierte DNA-FIT-Sonden mit gesteigerter Helligkeit zur vereinfachten RNA-Detektion

verwendet, wobei **neu-TO-a** mit den übrigen Positionen zu dual-markierten Sonden kombiniert wurde, sodass Abstände von 0 Nt (**neu-TOTO-ab**) bis zu 13 Nt (**neu-TOTO-ao**) realisiert werden konnten (Tabelle 4.3.2). Da für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen nicht die Intensität bei einer bestimmten Wellenlänge, sondern die Emission über einen weiteren Bereich relevant ist, wurden die Sonden zusätzlich anhand ihrer Quantenausbeute (Φ , relativ zu ATTO-520), dem Anstieg der Quantenausbeute (Φ/Φ_0) sowie ihrer Helligkeit (Br) charakterisiert. Die vollständigen Absorptions- und Emissionsspektren befinden sich im Anhang (Abb. 9.1.5 und 9.2.1).

Tabelle 4.3.2: Schmelztemperaturen und Fluoreszenzeigenschaften einfach und doppelt TO-markierter Neuraminidase-Sonden.

neu-TO-	Sequenz, X = Ser(TO)	Abst. / Nt	T _M / °C	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	I/I ₀	Br ^a
a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTAT	-	63	0.019	0.14	7.5	6.7	4.2
b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTAT	-	58	0.028	0.16	5.9	5.6	7.9
c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTAT	-	62	0.036	0.24	6.7	12.2	5.8
d	GGTTTCAGTAXATTATGCCGTTGTAT	-	61	0.024	0.08	3.4	3.7	2.6
e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTAT	-	64	0.023	0.23	10.0	10.6	9.3
f	GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTAT	-	62	0.033	0.15	4.6	5.0	3.0
g	GGTTTCAGTTATXATGCCGTTGTAT	-	62	0.037	0.06	1.5	1.6	2.3
h	GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTAT	-	63	0.033	0.16	4.8	6.2	7.4
i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTAT	-	60	0.030	0.04	1.4	1.4	1.7
j	GGTTTCAGTTATTATXCCGTTGTAT	-	60	0.043	0.14	3.3	3.2	6.2
k	GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTAT	-	58	0.046	0.22	4.8	4.8	6.2
l	GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTAT	-	61	0.016	0.11	6.9	6.6	3.4
m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTAT	-	61	0.020	0.18	9.0	9.7	5.8
n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXGTAT	-	61	0.019	0.15	7.5	12.0	7.6
o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXGTAT	-	62	0.029	0.10	3.5	3.3	1.7
neu-TOTO-	Sequenz, X = Ser(TO)	Abst. / Nt	T _M / °C	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	I/I ₀	Br ^a
ab	GGTTTCXXTTATTATGCCGTTGTAT	0	60	0.010	0.03	2.6	2.7	2.1
ac	GGTTTCXGXTATTATGCCGTTGTAT	1	58	0.036	0.11	3.2	4.7	9.0
ad	GGTTTCXGTAXATTATGCCGTTGTAT	2	59	0.039	0.14	3.5	6.1	7.6
ae	GGTTTCXGTTXTTATGCCGTTGTAT	3	61	0.013	0.14	10.3	15.4	7.3
af	GGTTTCXGTTAXTATGCCGTTGTAT	4	59	0.015	0.08	5.6	8.2	4.6
ag	GGTTTCXGTTATXATGCCGTTGTAT	5	59	0.019	0.04	2.3	3.4	2.7
ah	GGTTTCXGTTATTXTGCCGTTGTAT	6	55	0.019	0.09	4.8	6.0	4.8
ai	GGTTTCXGTTATTAXGCCGTTGTAT	7	59	0.023	0.05	2.0	4.8	3.3
aj	GGTTTCXGTTATTATXCCGTTGTAT	8	58	0.030	0.12	3.9	5.2	7.3
ak	GGTTTCXGTTATTATGXCGTTGTAT	9	53	0.023	0.12	5.2	6.8	5.5
al	GGTTTCXGTTATTATGCXGTTGTAT	10	51	0.024	0.07	2.8	12.1	3.9
am	GGTTTCXGTTATTATGCCXTTGTAT	11	54	0.016	0.10	6.3	10.9	5.7
an	GGTTTCXGTTATTATGCCGXGTAT	12	58	0.018	0.11	5.9	8.9	7.0
ao	GGTTTCXGTTATTATGCCGTXGTAT	13	55	0.018	0.07	3.7	5.9	4.0
ch	GGTTTCAGXTATTXTGCCGTTGTAT	4	54	0.015	0.14	9.6	18.0	9.8
en	GGTTTCAGTTXTTATGCCGXGTAT	8	61	0.014	0.17	12.5	18.0	12.0
cn	GGTTTCAGXTATTATGCCGXGTAT	10	57	0.024	0.14	6.1	7.8	8.8

Bedingungen: T_M: 1 μ M Sonde und 1 μ M **neu**-RNA in PBS, Fluoreszenz: siehe Tabelle 4.3.1. [a] Br = Helligkeit in mmol·cm⁻¹.

Die Quantenausbeute des **Ser(TO)** liegt für einfach-markierte Sonden im Bereich von ca. 0.01 bis 0.05 im Einzelstrang und 0.04 bis 0.24 im Duplex mit RNA. Der Anstieg der

Quantenausbeute unterscheidet sich geringfügig vom Anstieg der Fluoreszenzintensität bei $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$ (I/I_0), der grundsätzliche Trend ist jedoch unverändert. Dies ist den geringfügigen Veränderungen in den Absorption- bzw. Emissionsspektren vor und nach der Hybridisierung geschuldet. Die Helligkeit im Doppelstrang ist das Produkt der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge ($\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$). Für Sonden mit hoher Quantenausbeute wurde nicht zwangsläufig eine große Helligkeit erhalten (z.B. **neu-TO-c**), da der Extinktionskoeffizient vom Sequenzkontext abhängt. Folglich sind für eine besonders helle Sonde ein großes Absorptionsvermögen sowie eine große Quantenausbeute notwendig (z.B. **neu-TO-e**).

Der Einbau eines zweiten TO resultierte – analog zu den Ergebnissen der ein- bis vierfach-markierten Sonden – in der Zunahme des Extinktionskoeffizienten, jedoch wurde die Quantenausbeute um nahezu 50% reduziert (maximal 0.14), sodass die Helligkeit im Bereich einfach-markierter TO-Sonden lag. Um die Abstandsabhängigkeit des Energietransfers zu untersuchen, wurde die gegenseitige Löschung (SQ, Selbst-*Quenching*) beider TO-Einheiten quantifiziert. Das SQ ist ein Maß für den Verlust an Fluoreszenzintensität durch die Wechselwirkung beider Chromophore im Vergleich zu den einfach-markierten Vorläufersonden (vgl. Kapitel 4.2.1). Aus Abbildung 4.3.5A wird ersichtlich, dass das SQ bei kurzem Abstand besonders stark ist und mit steigendem Abstand abnimmt. Die lokalen Minima bei vier und acht Nukleotiden Abstand könnten die ungünstige Orientierung der Dipolmomente im Doppelstrang, verursacht durch die Helix-Windung, widerspiegeln. Jedoch genügen auch 13 Nukleotide Abstand nicht, um die Chromophore vollständig voneinander zu entkoppeln. Unter der Annahme eines A-Typ-Duplex für RNA:DNA würde sich ein Abstand von 2.9 Å pro Basenpaar ergeben, sodass die Chromophore maximal 4.1 nm ($14 \times 0.29 \text{ nm}$) voneinander entfernt wären. Dies würde deutlich geringer sein als der berechnete Förster-Radius für Cyaninfarbstoffe, wodurch ein Energietransfer auch bei diesen Distanzen plausibel erscheint.^[222]

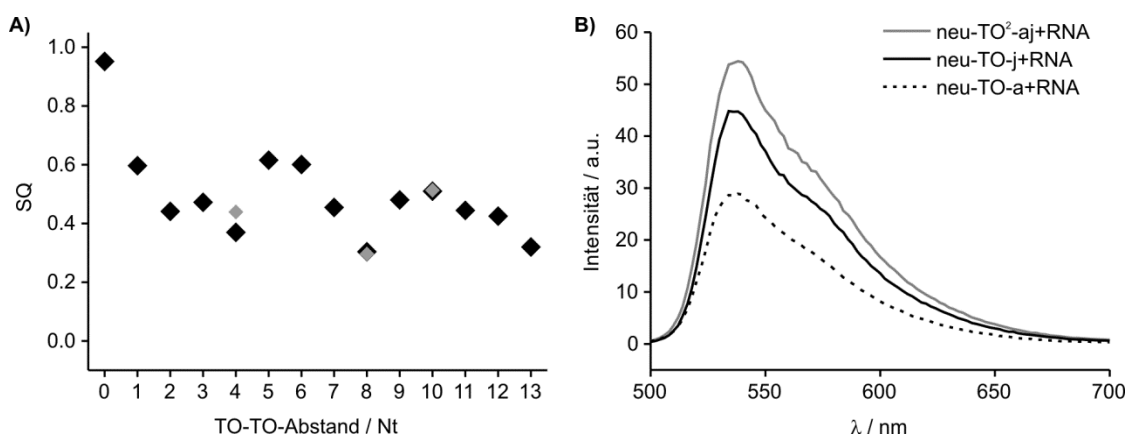


Abbildung 4.3.5: A) Abhängigkeit des Selbst-*Quenching* ($SQ = 1 - (I(xy)/(I(x)+I(y)))$) vom TO-TO-Abstand; mit $I(x)$ und $I(y)$ als Intensitäten der einfach-markierten Sonden und $I(xy)$ der Intensität der doppel-markierten Sonde, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$; Abstandsoptimierung (schwarze Punkte), Kombinationen guter TO-Positionen (graue Punkte, vgl. Tabelle 4.3.2). B) Vergleich der Fluoreszenzemission der doppel-markierten Sonde (**neu-TOTO-aj**, 8 Nt) mit den einfach-markierten Sonden (**neu-TO-a** und **neu-TO-j**) im Duplex. Bedingungen: siehe Abb. 4.3.2.

Es bestätigte sich die Hypothese, dass die Kombination starker TO-Positionen zu verbesserten Fluoreszenzeigenschaften führt. So zeichneten sich **neu-TOTO-ae** und **neu-TOTO-an** durch große Fluoreszenzanstiege und große Helligkeiten aus, während **neu-TOTO-ai** und **neu-TOTO-ao** nur eine geringe Leistungsfähigkeit zeigten. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden dual-markierte Sonden guter Positionen (**neu-TO-c**, **-h**, **-e**, **n**) mit den Abständen von vier, acht und zehn Nukleotiden realisiert (Tabelle 4.3.2). Mit **neu-TOTO-ch** und **neu-TOTO-en** wurden erstmals Sonden erhalten, deren Helligkeit größer als die einfach TO-markierter Sonden war. Trotz des Selbst-*Quenching* (graue Punkte, Abb. 4.3.5A) zeigten diese Kombinationen, dass durch geschickte Kombination der Vorläufersonden eine vergrößerte Helligkeit erzielt werden kann.

4.3.4 Dual-markierte TOJO-Sonden mit vergrößerte Helligkeit

Um die gegenseitige Löschung als den begrenzenden Faktor der Helligkeit zu umgehen, wurde ein heller Emitter (großer Extinktionskoeffizient und große Quantenausbeute) zum Energietransfer mit TO benötigt. Das JO-Chromophor (Abb. 4.3.6B) ist ca. 10 nm rotverschoben zu TO und empfahl sich durch seinen großen Extinktionskoeffizienten (bis zu $120.000 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$) sowie seine große Quantenausbeute (bis zu 0.83, siehe Tabelle 4.2.3). Zusätzlich ermöglicht die spektrale Überlappung von TO und JO (Abb. 4.3.6C) die simultane Anregung beider Chromophore, woraus eine besonders große Lichtaufnahme resultiert. Im Einzelstrang sollte die Kombination von TO und JO ein effizientes Löschen durch Aggregation erfahren, während im Doppelstrang beide Chromophore angeregt werden und TO durch einen Försterprozess entlang des Energiegradienten zusätzlich zur Emission von JO beiträgt. Der Energietransfer in Richtung TO sollte, aufgrund der vergleichsweise geringen spektralen Überlappung, nur vermindert auftreten.

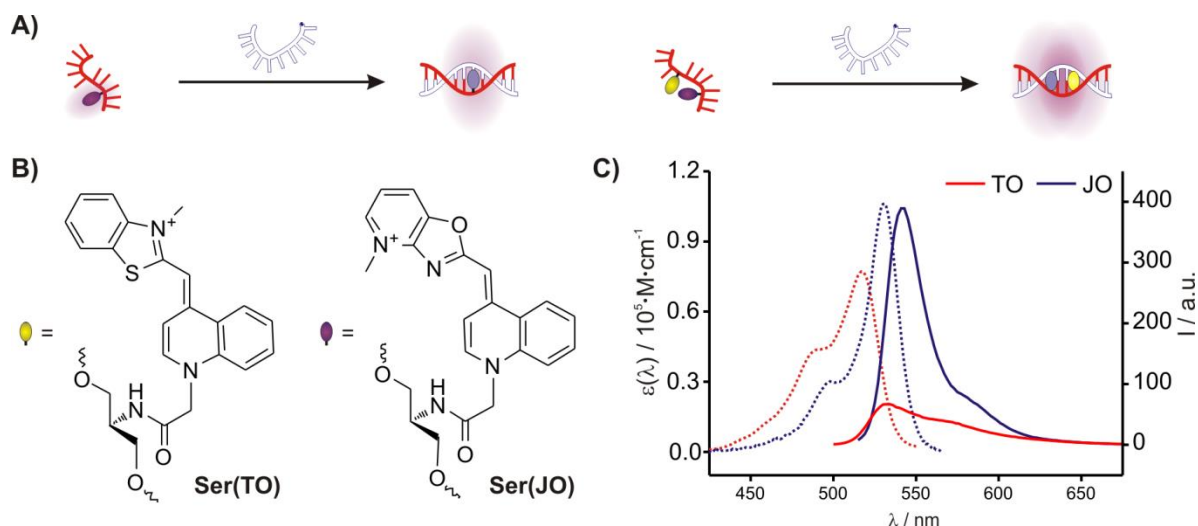


Abbildung 4.3.6: A) schematische Darstellung JO- und TOJO-markierter Sonden; B) Strukturen der **Ser(TO)**- und **Ser(JO)**-Monomere; C) Absorptions- und Emissionsspektren exemplarischer **Ser(TO)**- und **Ser(JO)**-markierter Sonden.

Die Synthese von **Ser(JO)** erfolgte analog zur Prozedur für **Ser(BO)** und **Ser(TO)**. Der JO-Farbstoff (**40**) wurde nach literaturbekannter Vorschrift^[190] hergestellt und mittels PyBOP,

PPTS und NMM in DMF auf das orthogonal-geschützte Serinolrückgrat (**13**) gekuppelt (Abb. 4.3.7). Nach dem Entfernen der Silylgruppe mittels TBAF-Trihydrat erfolgte die Phosphitylierung zu Verbindung (**43**) mittels 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit. In der DNA-Festphasensynthese zeigte **43** ebenfalls ausgezeichnete Kupplungseffizienz. Der modifizierte Heterozyklus bedingte die verringerte Stabilität gegenüber basischer Hydrolyse bei den vormals gewählten Bedingungen zur Freisetzung der Oligonukleotide von der festen Phase (55 °C, Ammoniak, 2 h). Die Verwendung von „ultramild-spaltbaren“ Schutzgruppen auf den Nukleobasen (dG^{iPrPac}, dA^{Pac} und dC^{Ac}) sowie Pac2O im *Capping*-Schritt erlaubte die Abspaltung durch Ammoniak bei Raumtemperatur innerhalb von 4 h, ohne das JO-Chromophor zu hydrolysieren. Analog zur Positionsoptimierung mit TO wurden JO-markierte FIT-Sonden für alle 15 Positionen der 27 Nt-langen *Neuraminidase*-Sequenz dargestellt und untersucht. Anschließend wurden die besten Positionen für JO mit besonders guten TO-Positionen zu dual-markierten TOJO-Sonden kombiniert.

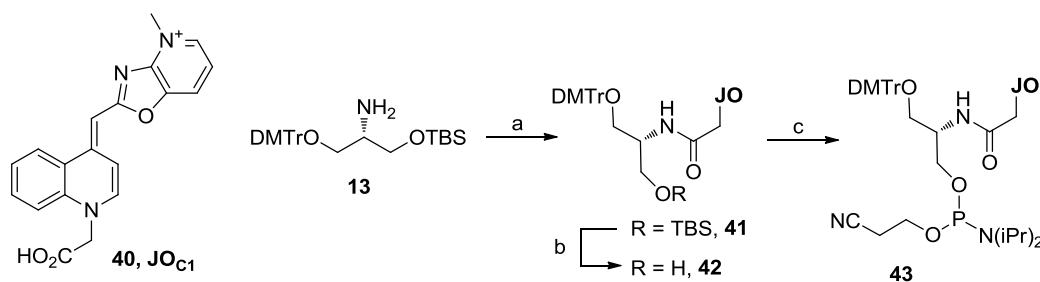


Abbildung 4.3.7: Synthese des **Ser(JO)**-Phosphoramidits. a) PyBOP, NMM, PPTS, DMF, 55%; b) TBAF·3H₂O, THF, 64%; c) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Et₃NiPr, CH₂Cl₂, 70-90%.

Die Anregung von JO-markierten FIT-Sonden erfolgte bei 500 nm, was etwa einem Drittel der maximalen Absorption entsprach und gleichzeitig die Aufnahme von vollständigen Emissionsspektren (510-700 nm) zur Bestimmung der Quantenausbeute zuließ. Während im Doppelstrang sehr hohe Quantenausbeuten von 0.51 (**neu-JO-i**) bis 0.83 (**neu-JO-e**) erreicht wurden, zeigten die Sonden bereits im Einzelstrang Werte 0.17 (**neu-JO-a**) bis 0.26 (**neu-JO-m**). Trotz Schwankungen in der Quantenausbeute ergaben sich stets Responsivitäten im Bereich von 3.4-4.6, sodass sich **Ser(JO)** als sehr robust, wenngleich weniger responsiv als **Ser(TO)** erwies. Die erzielten Helligkeiten lagen, aufgrund der hohen Quantenausbeute und trotz der relativ geringen Absorption bei 500 nm, deutlich über den für TO erzielten Werten (maximal 26.1 mmol·cm⁻¹). Wie auch für TO wurden für die Positionen **neu-i** und **neu-o** die geringsten Helligkeiten (15.8-16.7 mmol·cm⁻¹) erzielt. Dies suggeriert eine Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften ähnlich dem **Ser(TO)**, wenngleich weniger stark ausgeprägt.

4.3. Dual-markierte DNA-FIT-Sonden mit gesteigerter Helligkeit zur vereinfachten RNA-Detektion

Tabelle 4.2.3. JO- und TOJO-markierte FIT-Sonden.

neu-JO-	Sequenz, Y = Ser(JO)	Abst. / Nt	T _M / °C	Φ ₀	Φ	Φ/Φ ₀	I/I ₀	Br ^a
a	GGTTTC Y GTTATTATGCCGTTGTATTT	-	63	0.17	0.65	3.8	3.0	16.8
b	GGTTTC A YTTATTATGCCGTTGTATTT	-	59	0.21	0.81	3.9	3.5	26.1
c	GGTTTCAG Y TATTATGCCGTTGTATTT	-	60	0.21	0.65	3.2	3.5	21.9
d	GGTTTCAGT Y ATTATGCCGTTGTATTT	-	61	0.23	0.69	3.0	2.8	20.8
e	GGTTTCAGTT Y TTATGCCGTTGTATTT	-	64	0.18	0.83	4.6	4.5	24.8
f	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	60	0.19	0.72	3.7	3.5	24.8
g	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	62	0.21	0.67	3.3	3.1	21.9
h	GGTTTCAGTT A YTGCCGTTGTATTT	-	62	0.18	0.80	4.4	4.2	24.3
i	GGTTTCAGTT A YAGCCGTTGTATTT	-	60	0.21	0.51	2.4	2.1	15.8
j	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	58	0.22	0.78	3.6	3.3	24.1
k	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	58	0.23	0.74	3.3	3.1	22.4
l	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	60	0.19	0.67	3.5	2.7	17.7
m	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	62	0.26	0.81	3.1	2.9	21.9
n	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	59	0.24	0.75	3.2	3.1	23.0
o	GGTTTCAGTT A YATGCCGTTGTATTT	-	61	0.23	0.62	2.7	2.3	16.7
neu-TOJO-	Sequenz, X = Ser(TO), Y = Ser(JO)	Abst. / Nt	T _M / °C	Φ ₀	Φ	Φ/Φ ₀	I/I ₀	Br ^a
eb	GGTTTC A YTT X TTATGCCGTTGTATTT	2	58	0.03	0.30	10.3	15.0	23.5
ch	GGTTTCAG X TATT Y TGCCGTTGTATTT	4	60	0.04	0.35	9.4	11.4	23.7
ej	GGTTTCAGTT X TTAT Y CCGTTGTATTT	4	58	0.03	0.35	11.1	13.6	27.8
nh	GGTTTCAGTT A YTGCC X TGTATTT	5	59	0.03	0.28	10.1	12.7	19.9
cj	GGTTTCAG X TATT Y CCGTTGTATTT	6	55	0.03	0.36	12.1	23.3	28.5
me	GGTTTCAGTT Y TTATGCC X TTGTATTT	7	62	0.03	0.29	9.8	10.9	24.0
ne	GGTTTCAGTT Y TTATGCC X TGTATTT	8	62	0.03	0.33	9.8	11.0	26.7
mb	GGTTTC A YTTATTATGCC X TTGTATTT	10	58	0.04	0.27	7.7	8.2	24.4

[a] Br = Helligkeit in mmol·cm⁻¹. Bedingungen: T_M: 1 μM Sonde und 1 μM **neu**-RNA in PBS, Fluoreszenz: 0.5 μM Sonde und 2.5 μM **neu**-RNA, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), λ(ex) = 500 nm, λ(em) = 510-700 nm, λ(em) für I/I₀ = 543 nm; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Mit den besten Positionen für TO (**neu**-TO-**c**, **-e**, **-m**, **-n**) und JO (**neu**-JO-**b**, **-e**, **-h**, **-j**) wurden acht dual-markierte TOJO-Sonden verschiedener Abstände (2, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 Nt) realisiert. Die Aggregation der Chromophore im Einzelstrang verursachte eine dramatische Abnahme der Quantenausbeute (Φ₀ = 0.03-0.04), sodass Werte im Bereich von einfach TO-markierten Sonden erhalten wurden. Im Gegensatz zur Kombination zweier TO-Einheiten wurde keine signifikante Rotverschiebung der Emission beobachtet. Die hybridisierungsinduzierte Separierung und Interkalation beider Chromophore verursachte einen dramatischen Anstieg der Emission. So zeigten sieben der acht Sonden einen Anstieg der Quantenausbeute von Φ/Φ₀ ≈ 10, die Intensivierung der Fluoreszenzintensität (λ(em) = 543 nm) erreichte sogar Werte von bis zu 23. Aufgrund des großen Extinktionskoeffizienten und der hohen Quantenausbeute stieg die Helligkeit auf Maximalwerte von 28.5 mL·mol⁻¹·cm⁻¹. Da TOJO-markierte Sonden sich als geringfügig heller als JO-Sonden und responsiver als TO bzw. TOTO-Sonden herausstellten, wurde ebenfalls deren gegenseitige Löschung (*Quenching*, Q = 1 - I(TOJO)/(I(TO)+I(JO))) bei λ(em) = 535 nm untersucht (Abb. 4.2.8A).

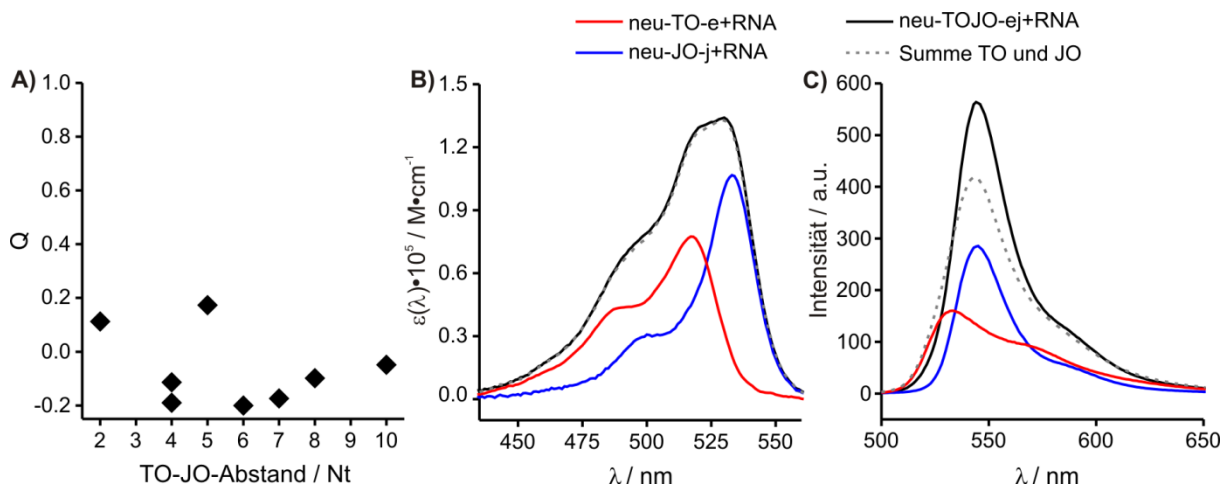


Abbildung 4.3.8: A) *Quenching* ($Q = 1 - (I(\text{TOJO}) / (I(\text{TO}) + I(\text{JO})))$) mit $I(\text{TO})$ und $I(\text{JO})$ als Intensität der einfach-markierten TO- bzw. JO-Sonde sowie $I(\text{TOJO})$ als Intensität der doppelt-markierten Sonde, jeweils bei $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$ nach Anregung bei $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$. B) Absorptions- und C) Emissionsspektren der angegebenen Sonden bzw. der berechneten Summe beider einfach-markierter Sonden. Bedingungen: $0.5 \mu\text{M}$ Sonde und $2.5 \mu\text{M}$ neu-RNA, bei Zugabe in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, $\text{slit}(\text{ex}) = 5 \text{ nm}$, $\text{slit}(\text{em}) = 5 \text{ nm}$, 37°C .

Die gegenseitige Löschung fällt für TOJO-Sonden deutlich geringer aus als für TOTO-Sonden: Es wurden Werte von maximal 0.2 erhalten, während ein Großteil der Sonden „negative Löschung“ zeigte (siehe Abb. 4.3.8A), sodass die Fluoreszenzintensität der TOJO-Sonden oberhalb der theoretischen Addition der TO- und JO-Emission lag (siehe auch Abb. 4.3.8C und Abb. 9.2.3 im Anhang). Offensichtlich wirkt TO als Lichtkollektor und überträgt Energie entlang des Gradienten auf JO anstatt selbst zu emittieren. Die Absorptionsspektren bestätigten die vergrößerte Lichtaufnahme. Für TOJO-Sonden wird exakt die Absorption der theoretischen Addition der einfach-markierten Sonden erhalten (Abb. 4.2.8B), hingegen ist das Emissionsspektrum etwas schmäler als die Summe von TO und JO und erreicht einen größeren Maximalwert (Abb. 4.2.8C, siehe auch Anhang Abb.8.2.3). Besonders die Tatsache, dass bei einigen Sonden die TOJO-Emission im Bereich von 500-525 nm unterhalb der TO-Emission liegt, belegt den Energietransfer von TO zu JO. Es bestätigte sich die Vermutung, dass durch die größere Überlappung von TO-Emission und JO-Absorption, der Energietransfer von TO auf JO favorisiert wird (siehe auch Abb. 4.3.6C).

Während TO-Sonden sich als äußerst zuverlässig hinsichtlich des Anstiegs der Fluoreszenzintensität und der Quantenausbeute erwiesen, konnten JO-Sonden durch ihre große Helligkeit überzeugen (Abb. 4.3.9). Unabhängig vom vorliegenden Mechanismus, welcher an dieser Stelle nicht eingehender untersucht wurde, lässt sich festhalten, dass TOJO-Sonden die besten Eigenschaften der TO- und JO-Sonden kombinieren und besonders helle und responsive Sonden ergeben. Solch eine Optimierung ist lediglich mit FIT-Sonden, nicht jedoch mit konventionellen Sonden möglich.

4.3. Dual-markierte DNA-FIT-Sonden mit gesteigerter Helligkeit zur vereinfachten RNA-Detektion

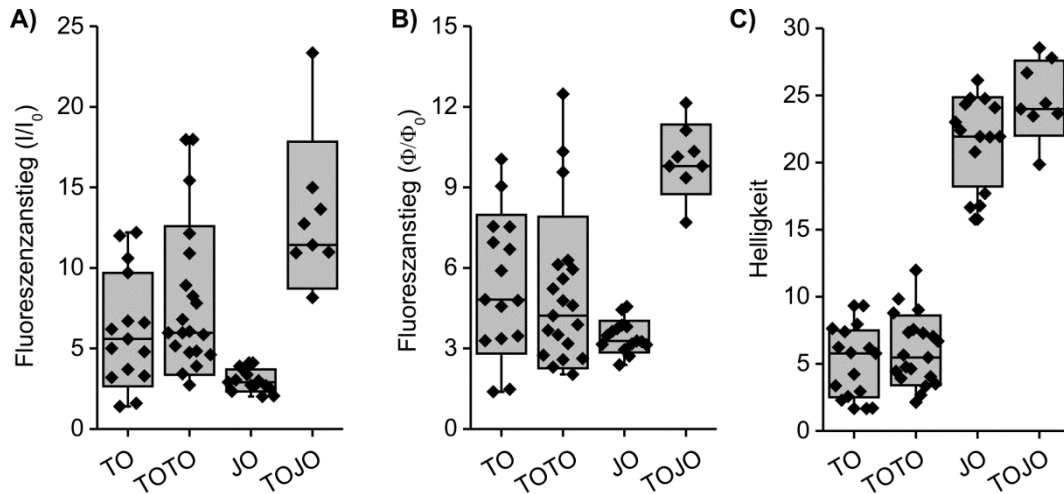


Abbildung 4.3.9: Absolute Werte (schwarze Punkte) A) des Anstiegs der Fluoreszenzintensität, B) des Anstiegs der Quantenausbeute und C) der absoluten Helligkeit der TO-, TOTO-, JO- und TOJO-Sonden (Tabelle 4.2.2 und 4.2.3). Schwarze horizontale Linien entsprechen dem Halbmaximum, die graue Box gibt den Bereich der Standardabweichung an, die schwarze vertikale Linie verbindet die Extremwerte.

Die Fluoreszenzeigenschaften der FIT-Sonden wurden mit *Molecular Beacons* und einer linearen, FAM-markierten DNA verglichen (Tabelle 4.3.4). Die FAM-DNA besitzt eine große Helligkeit ($Br = 20.5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ist jedoch nicht-responsiv. Zur Anwendung in Zellen müsste ungebundene Sonde durch (zeit)aufwendige Waschschrte entfernt werden. Im Gegensatz dazu erfährt der optimierte *Molecular Beacon* (**neu-MB-1**) einen starken Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung; die erzielbare Helligkeit ist jedoch, aufgrund der Anwesenheit des *Quenchers*, stets geringer als jene *Quencher*-freier Sonden. Im direkten Vergleich der verschiedenen Sondentypen zeigten TOJO-Sonden sowohl in der Helligkeit als auch in der Responsivität die größte Leistungsfähigkeit.

Tabelle 4.3.4. Vergleich verschiedener Sonden zur Detektion von **neu-RNA**.

neu-	Typ	Sequenz, X = TO, Y = JO	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br^a
TO-e	1xTO	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	0.02	0.23	10.0	9.3
TOTO-en	2xTO	GGTTTCAGTTXTTATGCCGXGTATTT	0.01	0.17	12.5	12.0
JO-e	1xJO	GGTTTCAGTTYTTATGCCGTTGTATTT	0.14	0.63	4.6	18.9
TOJO-cj	TOJO	GGTTTCAGXTATTATYCCGTTGTATTT	0.03	0.36	12.1	28.5
MB-1	<i>Molecular Beacon</i>	6FAM-CCGACTTTCAGTTATTATGCCGTTGTATTTGTCGG-BHQ-1 ^b	0.03 ^c	0.26 ^c	8.7	15.5 ^c
MB-2	<i>Molecular Beacon</i>	6FAM-CGCGACGGTTTCAGTTATTATGCCGTTGTATTTGTCGG-BHQ-1 ^b	0.03 ^c	0.12 ^c	4.0	8.5 ^c
FAM	<i>FISH</i>	GGTTTCAGTTATTATGCCGTTGTATTT-6FAM	0.57	0.46	0.8	20.5

Bedingungen: Für TO und siehe Tabelle 4.3.1, für JO und TOJO siehe Tabelle 4.3.2; Für **neu-MB-1** und **-2** sowie **neu-FAM**: 0.5 μM Sonden und 5 Äq. **neu-RNA**, bei Zugabe, in PBS; $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 495\text{-}700 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em})$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C. [a] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in $\text{mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$; [b] die unterstrichenen Nukleotide bilden den Stamm des MB; [c] die Absorption des Quenchers wurde nicht subtrahiert. BHQ1 = Black-Hole-Quencher-1.

4.3.5 Waschfreie *in-situ* Hybridisierung zur Detektion von *Oskar*-mRNA

In Zusammenarbeit mit Dr. Imre Gaspar aus der Arbeitsgruppe von Dr. Anne Ephrussi (EMBL-Heidelberg) sollten die TOJO-FIT-Sonden in der RNA-Detektion mit einfach-markierten FIT-Sonden aber auch mit konventioneller *in-situ* Hybridisierung verglichen werden. Dazu sollte *Oskar*-mRNA in Eizellen von *Drosophila melanogaster* detektiert werden. Die Ei-Kammer besteht aus Schwesterzellen sowie dem Oozyten, welche von einer Schicht aus Epithelzellen umgeben ist. *Oskar*-mRNA wird in den Schwesterzellen produziert, in die Eizelle transportiert und im Laufe der Oogenese am posterioren Pol akkumuliert (Abb. 4.3.9).

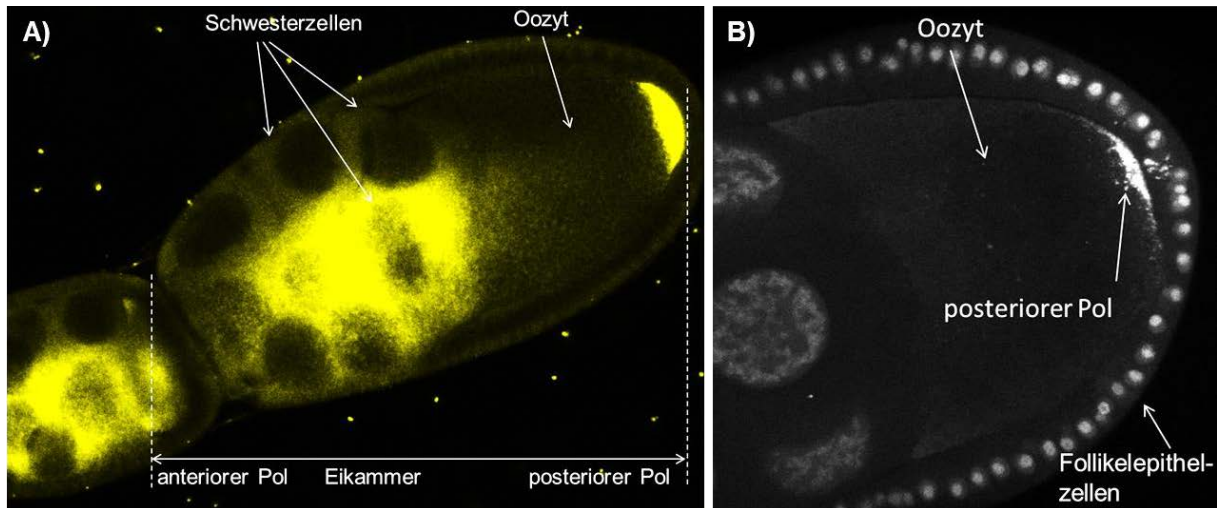


Abbildung 4.3.10: Übersicht der Ei-Kammer mit zwölf Schwesterzellen, welche *Oskar*-RNA exprimieren und des Oozyten, in welchem *Oskar* am posterioren Pol akkumuliert.

Um ein aufwendiges Positionsscreening der Farbstoffe zu vermeiden, wurden lediglich drei Positionen für **Ser(TO)** und **Ser(JO)** im Abstand von vier Nukleotiden innerhalb eines 21mer Segments untersucht (siehe Tabelle 4.2.5). Anschließend wurden die beiden besten Positionen für TO und JO miteinander kombiniert. Als Ziel wurde ein Segment des *Oskar*-Transkripts (Nt. 2209-2229) nahe des Stopp-Codons ausgewählt.

Tabelle 4.3.5: TO-, JO- und TOJO-Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

osk	Sequenz, X = TO, Y = JO	$T_M / ^\circ\text{C}$	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br ^a
TO-a	CTCG X TTCAATAACTTGCACT	56	0.04	0.31	8.7	14.3
TO-b	CTCGTTTCAXTA X ACTTGCACT	55	0.07	0.18	2.7	8.3
TO-c	CTCGTTTC A AATAAC X TGCACT	55	0.02	0.16	7.5	6.4
JO-a	CTCGYTTCAATAACTTGCACT	54	0.26	0.77	3.0	28.3
JO-b	CTCGTTTCAYTA A CTTGCACT	56	0.53	0.79	1.5	26.1
JO-c	CTCGTTTC A AATAAC Y TGCACT	56	0.27	0.77	2.8	25.2
TOJO-ac	CTCG X TTCAATAAC Y TGCACT	47	0.05	0.3	6.2	24.1
TOJO-ca	CTCGYTTCAATAAC X TGCACT	51	0.06	0.42	7.6	29.1

Bedingungen: Für TO und siehe Tabelle 4.3.1, für JO und TOJO siehe Tabelle 4.3.2; Ziel-RNA: ACUGCAAGUUAUUGAAACGAG; [a] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Wie bereits im Fall der *Neuraminidase*-Zielsequenz zeigte TO auf zwei Drittel der Positionen gute Fluoreszenzeigenschaften (**osk-TO-a, -c**), während JO stets geringe Responsivität aber große Helligkeit zeigte. Die hervorragende Fluoreszenzeigenschaften der Kombination von

TO und JO zu **osk-TOJO-ac** und **osk-TOJO-ca** bestätigte die Übertragbarkeit der dualen Markierung auf weitere Sondensequenzen. Die vollständigen Absorptions- und Emissionsspektren befinden sich im Anhang (Abb. 9.2.4). Die hellsten Vertreter der jeweiligen Sonden (**osk-TO-a**, **osk-JO-a**, **osk-TOJO-ca**) wurden in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

Um die Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen Markierungen in der Fluoreszenzmikroskopie zu vergleichen, wurde ein Protokoll zur waschfreien *in-situ* Hybridisierung entwickelt. Dazu wurden Oozyten von *Drosophila melanogaster* mittels para-Formaldehyd (4%, aq.) fixiert und drei Minuten bei 92 °C denaturiert, um eventuelle Überstrukturen aufzubrechen. In Anwesenheit von 0.3% des Detergenz Tween-20 wurden die fixierten Zellen permeabilisiert, sodass die Sonden (0.2 µM) innerhalb von 45 min bei 37 °C mit Ziel-RNA hybridisieren konnten. Anschließend wurden die Zellen in Puffer (10mM HEPES, 100 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.3% Tween-20, pH = 7.7) aufgenommen und auf Objektträger übertragen. Aufgrund der einfachen Prozedur und der Vermeidung von Waschschritten, betrug die Zeitspanne von Beginn der Präparation bis zur Mikroskopie lediglich 90 Min. Im Gegensatz dazu benötigte die konventionelle *in-situ* Hybridisierung mittels DIG-markierten Sonden, Antikörpermarkierung und Waschschritten ca. 18 h. Aufgrund der hohen Sondenresponsivität konnte *Oskar*-mRNA in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Oozyten visualisiert werden (siehe Pfeile in Abbildung 4.3.11).^[223] Zum Vergleich der unterschiedlichen Sondentypen wurde die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SBR) bei gleichen Mikroskopeinstellungen bestimmt. Dies ergab sich aus dem Verhältnis des mittleren Signals am posterioren Pol (rote Pfeile Abb. 4.3.11) mit dem mittleren Signal in den umgebenden Epithelzellen, welche keine *Oskar*-RNA exprimieren (blaue Pfeile, Abb. 4.3.11). Unabhängig ob die Anregung der Reporter beim Maximum von TOJO und JO ($\lambda(\text{ex}) = 530 \text{ nm}$) oder dem Maximum von TO ($\lambda(\text{ex}) = 514 \text{ nm}$) erfolgte, wurde für **osk-TOJO-ca** die größte SBR und die optimale Leistungsfähigkeit in der Fluoreszenzbildgebung festgestellt (Abb. 4.2.11D). Üblicherweise werden solche Experimente an einfachen Epifluoreszenzmikroskopen durchgeführt. Durch eine duale Anregung bei 514 und 530 nm wurde eine Breitbandanregung simuliert, wie sie üblicherweise mit Filtern erzielt wird. Als Detektor wurde ein einfacher Photoelektronenvervielfacher mit offener Lochblende und geringer Signalverstärkung gewählt. Unter diesen Einstellungen zeigte sich erneut **osk-TOJO-ca** als optimale Sonde zur Visualisierung der *Oskar*-Lokalisation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Eizelle (Abb. 4.3.11A'). **Osk-JO-a** zeigte, aufgrund der geringen Responsivität (Abb. 4.3.11B'), stets ein starkes Hintergrundsignal, während **osk-TO-a**, durch die geringe Helligkeit nur ein geringes spezifisches Signal für *Oskar*-RNA zeigte (Abb. 4.3.11C').

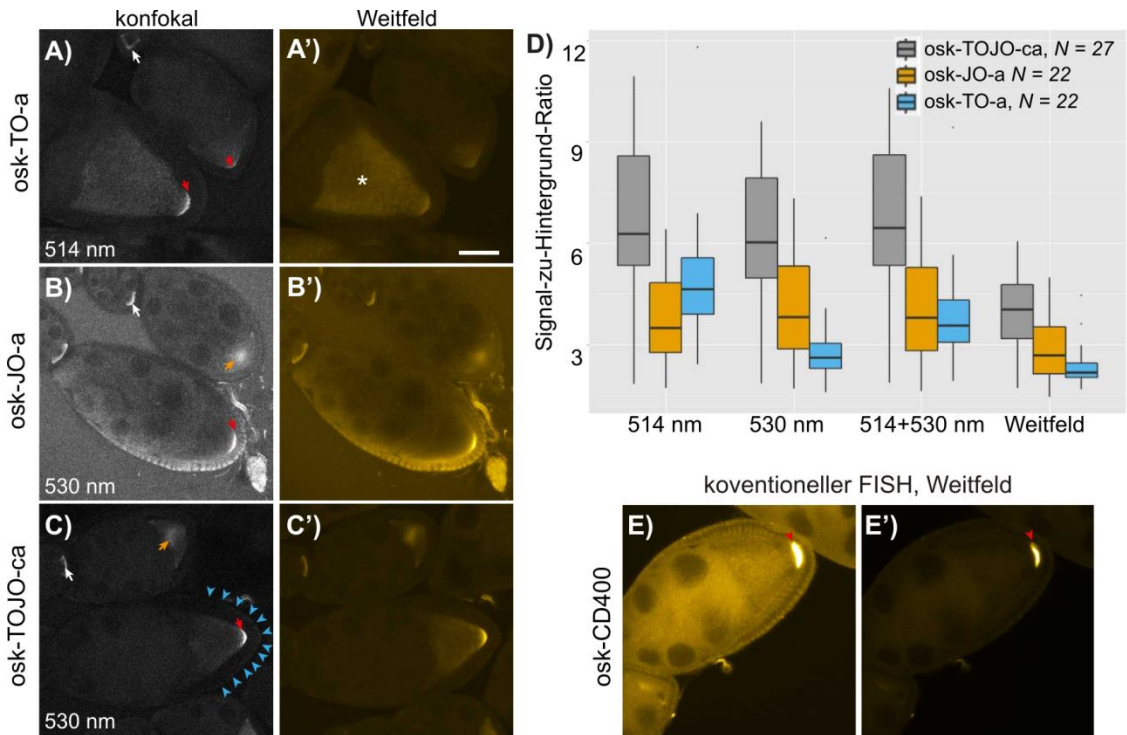


Abbildung 4.3.11: Waschfreie *FISH*-Experimente zur Detektion von *Oskar* in *Drosophila* Oozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien. A-C') Repräsentative Ergebnisse des *FISH* mit 0.2 μ M **osk-TO-a** (A-A'), **osk-JO-a** (B-B') und **osk-TOJO-ca** (C-C'). Die Anregung zur konfokalen Mikroskopie (A-C) erfolgte bei der angegebenen Wellenlänge, nahe dem Absorptionsmaximum. Zur Weitfeld-Mikroskopie wurde durch die simultane Anregung mittels der Laserlinien 510-518 sowie 526-530 nm und offener Lochblende simuliert. Weiße Pfeile markieren *Oskar* in frühen Entwicklungsstadien, orange Pfeile in Stufe 8 der Oogenese, rote Pfeile in Stufe 9-10 der Oogenese, wenn *Oskar* am posterioren Pol akkumuliert. Der Stern markiert die starke, von Yolk-Granula verursachte Autofluoreszenz (C'). E-E') zeigt konventionelle DIG-HRP-*FISH*-Experimente (siehe Kapitel 6.4.1). Die Maßstabsleiste entspricht 50 μ M. Die Abbildungen A-E sind auf die gleichen Intensitätseinstellungen skaliert, Abbildung E' ist zur Sättigung des maximalen Signals skaliert. Abbildung D) zeigt die Signal-zu-Hintergrund-Ratio der FIT-Sonden. Die mittlere Signalintensität wurde am posterioren Pol gemessen und durch das mittlere Hintergrundsignal in den umgebenden Epithelzellen geteilt (blaue Pfeile). Die Anregung erfolgte bei 514 nm bzw. 530 nm zur konfokalen Mikroskopie sowie bei 514+530 nm zur simulierten Weitfeld-Mikroskopie; *Mann Whitney U Test*, $p < 0.001$, $\alpha = 0.05$ und Anzahl der untersuchten Oozyten (N).

Zusammenfassend konnte mit der TOJO-markierten Sonde **osk-TOJO-ca** eine hervorragende Leistungsfähigkeit in *FISH*-Experimenten erzielt werden. Die Helligkeit und Responsivität der Sonden ermöglichte die Etablierung eines enorm zeitsparenden Protokolls zur RNA-Detektion in Geweben. Zusätzlich sind die Anforderungen an die Mikroskopie-Ausrüstung gering. RNA-Detektionsmethoden, welche durch Antikörper und Enzyme eine Amplifizierung des Signal generieren, erreichen zwar größere absolute Intensitäten (siehe Abb. 4.3.11 E-E'), jedoch muss hier der zeitliche und materielle Aufwand im Vergleich zu dem geringen Zugewinn an Information in Frage gestellt werden und ist besonders für umfangreiche Studien kaum praktikabel. Die deutlich verringerten Anforderungen an Zeit und Ausrüstung bei gleichzeitig hoher Sensitivität in der RNA-Detektion empfehlen TOJO-markierte FIT-Sonden auch für zukünftige RNA-Lokalisationsstudien.

4.3.6 Diskussion

Unter den zahlreichen Methoden zur RNA-Detektion nehmen Hybridisierungssonden eine Sonderstellung ein. In den vergangenen Jahren haben zahlreiche Innovationen im Bereich der Hybridisierungssonden die Responsivität bei Hybridisierung dramatisch verbessert. In den meisten Fällen lieferten effizientere *Quencher* ein deutlich verringertes Hintergrundsignal, sodass bis zu 400-fache Signalanstiege realisiert werden konnten.^[148] Allerdings wurde die Optimierung der maximal erzielbaren Helligkeit von Hybridisierungssonden kaum untersucht. Untersuchungen von Randolph *et al.* sowie Asanuma *et al.* zeigten, dass die Verwendung mehrerer Chromophore zur DNA-Markierung keine lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität bewirkt, sondern Chromophor-Chromophor- bzw. Chromophor-Nukleotid-Wechselwirkungen die Helligkeit beeinträchtigen.^[224, 225] Zusätzlich führte der Einbau mehrerer Reporter stets zu deutlich verminderten Duplexstabilitäten.

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass der Einbau mehrerer TO-Einheiten in FIT-DNA in gegenseitiger Löschung resultiert und keine verbesserten Helligkeiten liefert. Lediglich eine effiziente Löschung im Einzelstrang durch Aggregation wurde dadurch bewirkt, sodass der Fluoreszenzanstieg verbessert werden konnte. Im Gegensatz zu TO erwies sich das JO-Chromophor mit einem Extinktionskoeffizienten von bis zu $120000 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ und einer Quantenausbeute von bis zu 0.83 als besonders hell aber wenig responsiv. Aufgrund ihrer großen spektralen Überlappung ermöglicht die Kombination von TO und JO die simultane Anregung beider Chromophore. Ein Energietransfer von TO zu JO verhindert das gegenseitige *Quenching*, sodass TO als „Lichtsammler“ für das ohnehin helle JO wirkt. Im Einzelstrang hingegen löschen sich TO und JO gegenseitig durch Aggregation, sodass in der Summe besonders helle und responsive Sonden erhalten wurden.

Bei den *ECHO-Probes* (vgl. Kap. 2.4.4), wurden ebenfalls zwei TO-Einheiten in Abwesenheit von komplementärer Zielsequenz durch Aggregation gelöscht und zeigten einen starken Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung, jedoch wurde die Helligkeit in diesen Arbeiten nicht untersucht. Die publizierten Daten legen nahe, dass die maximale Intensität vergleichbar zu analogen, einfach TO-markierten Sonden ist.^[46] Kürzlich wurden stamm-markierte *Molecular Beacons* beschrieben (siehe Kap. 2.4.3), in denen das umgebungssensitive TO als Donor für den Energietransfer auf einen deutlich rot verschobenen Akzeptor (Thiazolrot) fungiert.^[173, 174] Die maximale Fluoreszenzintensität ist jedoch durch die Emission eines einzigen Farbstoffs limitiert. Gleiches gilt für dual-markierte, stammlose PNA-Beacons. Socher *et al.* erzielten durch die terminale Anbringung von rotverschobenen Chromophoren in PNA-FIT-Sonden exzellente Fluoreszenzanstiege von bis zu 450,^[195] jedoch basieren auch diese auf hoch effizienten Lösprozessen, welche vermutlich durch das hydrophobe PNA-Rückgrat begünstigt wurden. Die erzielte Helligkeit übertraf jene konventioneller FIT-Sonden jedoch nicht.

Der hier gezeigte Ansatz zur verbesserten Helligkeit basiert auf einer bislang einzigartigen Kombination verschiedener Mechanismen: 1) Die duale, interne Markierung von FIT-Sonden führt zum effizienten *Quenching* in Abwesenheit von komplementärer Zielsequenz; 2) die

Hybridisierung induziert die Auflösung der Aggregation und erzwingt die Interkalation beider Reporter; 3) beide Chromophore lassen sich simultan bei einer Wellenlänge anregen; 4) der Energietransfer über kurze Bereiche erfolgt entlang des Energiegradienten von einem umgebungssensitiven Reporter auf einen besonders hellen Emitter.^[226]

Die erhaltenen TOJO-Sonden erwiesen sich als heller und responsiver als *Molecular Beacons* und konventionelle, terminal-markierte *FISH*-Sonden. Wenngleich die Positionierung beider Chromophore optimiert werden muss, ist der Aufwand vergleichbar mit der Optimierung der Stamm- bzw. Schleifen-Region von *MBs*. Zwei der drei Positionen, die zur Detektion von *Oskar*-mRNA untersucht wurden, zeigten nützliche Fluoreszenzeigenschaften.

TOJO-Sonden überzeugten durch ihre Helligkeit und Responsivität in Fluoreszenzmikroskopieexperimenten und könnten aufgrund ihrer einfachen und zeitsparenden Handhabung in weiteren Studien zur RNA-Lokalisation Anwendung finden.

4.4 LNA-verstärkte FIT-Sonden zur Detektion von Ribonukleotidpartikeln in lebenden Zellen

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die duale Markierung von FIT-Sonden durch TO und JO deutlich gesteigerte Helligkeit und ausgezeichnete Responsivität zeigte. Diese beiden Eigenschaften erwiesen sich als bedeutsam in *FISH*-Experimenten für die effiziente Detektion bzw. Lokalisation von RNA. Leistungsfähige Reportersonden werden ebenfalls für die Lebendzell-RNA-Detektion und die Visualisierung der Bewegung von Ribonukleotidpartikeln (RNPs) benötigt. RNPs stellen die Transportform der mRNA dar und bestehen aus wenigen bis hin zu 10^2 RNA-Molekülen. Zusammen mit ihren RNA-bindenden Proteinen werden sie nach der RNP-Biogenese zum Zielort transportiert.^[227] Die Untersuchung und Beeinflussung der RNP-Bewegung ist besonders in der Entwicklungsbiologie von großem Interesse. Häufig werden solche Fragestellungen mit Hilfe transgener RNA-Detektionsmethoden adressiert. Responsive Hybridisierungs-sonden können hingegen auch Wildtyp-RNPs detektieren, sofern die Sonden neben den geeigneten Fluoreszenzeigenschaften (Helligkeit und Responsivität), resistent gegenüber dem Abbau durch Nukleasen sind und keine Spaltung der Ziel-RNA mittels RNase-H induzieren.

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels legen nahe, dass Nuklease-resistente TOJO-Sonden vielversprechend für *in vivo* Anwendungen wären. Allerdings ist die Verwendung von JO nicht ohne größere Anpassungen mit den chemischen Anforderungen Nuklease-resistenter Nukleotide kompatibel, da unter diesen Abspaltbedingungen das JO-Chromophor der basischen Hydrolyse unterliegen würde.

Neben der Verwendung mehrerer bzw. anderer Fluorophore, ermöglicht das Design der FIT-Sonden eine einzigartige Möglichkeit zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften. Wie bereits in Kapitel 2.1 und 2.3 sowie in Untersuchungen mit FIT-PNA beschrieben, besteht bei FIT-Sonden eine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Sequenzumgebung, welche die Lage und elektronische Umgebung des Chromophors definiert. Diese Umgebungssensitivität legt nahe, dass eine optimale Umgebung des Chromophors zu optimalen Fluoreszenzeigenschaften führen sollte. Da modifizierte Nukleotide die Geometrie und Stabilität der DNA beeinflussen war anzunehmen, dass solche Modifikationen in Nachbarschaft zu TO ebenfalls einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften bewirken und im Idealfall die Leistungsfähigkeit der Sonden verbessern.

4.4.1 Der LNA-Effekt in FIT-Sonden

Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität der TO im Duplex deutlich größer ausfällt, wenn RNA anstelle von DNA als Zielmolekül zur Hybridisierung verwendet wird (siehe Kap. 4.1.5). Eine mögliche Erklärung liefert die Geometrie der Duplex-Strukturen. Während der DNA:DNA-Duplex einem B-Typ entspricht, erzwingt die Hybridisierung der Sonde mit RNA eine Duplexgeometrie, die einer A-Typ-Helix deutlich ähnlicher ist. Dadurch ändert sich die Anordnung der Basen, die Größe der Furche, die Windung der Helix und somit auch die Lage und Umgebung des Chromophors. Besonders deutlich wird dies am Abstand

der Nukleobasen im Duplex, welcher von ca. 3.37 Å für DNA:DNA-Duplexe auf ca. 2.80 Å für DNA:RNA-Duplexe verringert wird.^[228]

Zur Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften von FIT-Sonden mittels modifizierter Nukleoside eignete sich besonders die Verwendung von *Locked Nucleic Acids* (LNA, siehe Kapitel 2.2). Basierend auf MD-Simulationen, Ladungstransfer-Messungen und NMR-Strukturanalysen in Lösung ist für LNA-modifizierte Oligonukleotide bei Hybridisierung mit komplementärer RNA eine weitere Verfestigung der A-Typ Helix und damit eine Verringerung des Internukleotidabstandes beschrieben. Auch wenn keine einheitliche Aussage getroffen werden kann, so bestätigen NMR-Strukturanalysen die kompaktere Struktur, sodass im Mittel ein Basenabstand von 2.55 Å anzunehmen ist (Abb. 4.4.1).^[63-67] Der tatsächliche Wert wird jedoch stets von der Oligonukleotid-Sequenz sowie der Positionierung der LNA-Modifikationen abhängen.^[66] Es war anzunehmen, dass die kompaktere Duplexstruktur durch den Einbau von LNA in DNA-FIT-Sonden die Rotation um die zentrale Methinbrücke des TO stärker einschränkt, sodass die Fluoreszenzquantenausbeute ansteigen sollte.

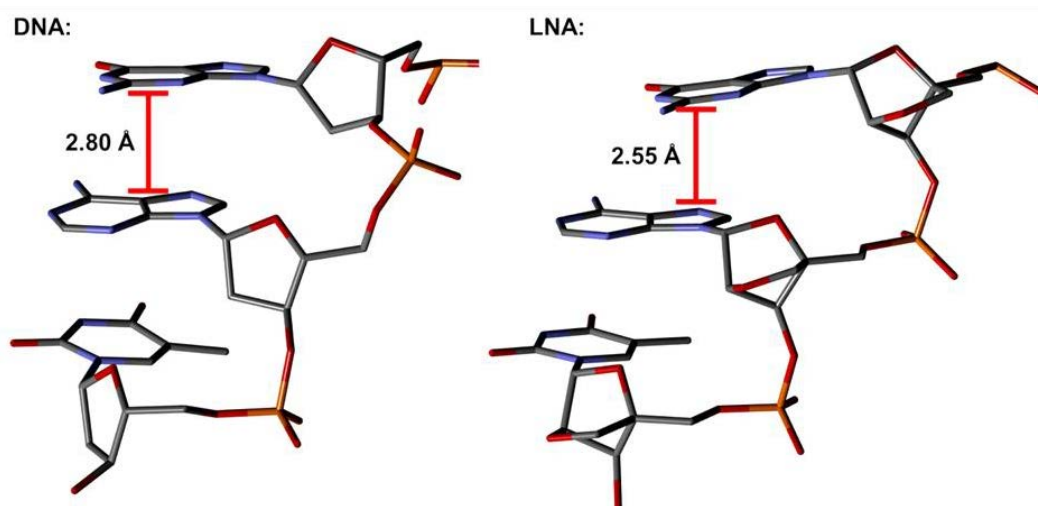


Abbildung 4.4.1: Ausschnitte der Strukturen von DNA (links, PDB:1HG9) und LNA (rechts, PDB:1H0Q) im Duplex mit RNA. Der RNA-Gegenstrang wurde zur besseren Übersichtlichkeit ausgeblendet.

Orientierende Ergebnisse zum Einbau und den Eigenschaften von LNA in FIT-Sonden wurden von Dipl. Chem. Simon Loibl (Arbeitsgruppe Seitz, HU-Berlin) in einer Kooperation mit Prof. Dr. J. Wengel am *Nucleic-Acids-Center* (Syddansk Universitet, Odense, Dänemark) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass LNA die Eigenschaften der FIT-Sonden beeinflusst:^[229] Es konnte eine signifikante Zunahme der Schmelztemperatur sowie erhöhte Einzelbasenselektivität festgestellt werden. Zusätzlich konnte eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden - auch wenn diese zum Zeitpunkt der Messungen nicht quantifiziert werden konnte. Mit Hilfe der von Dipl. Chem. Simon Loibl hergestellten Sonden (Abb. 4.4.2A) wurde im Rahmen dieser Experimente der Einfluss von LNA sowie deren Positionierung genauer untersucht. Die Synthese, Reinigung und Charakterisierung LNA-modifizierter FIT-Sonden erfolgte analog zu den konventionellen TO-FIT-Sonden. Die Kupplungszeit für LNA-Monomere wurde nach Herstellerangabe angepasst. Als Ziel-RNA

für diese Untersuchungen diene ein Sequenzabschnitt von *Influenza-H1N1-Neuraminidase*, welcher bereits zur Lebendzell-Bildgebung mittels PNA-FIT-Sonden herangezogen wurde.^[192] Die Positionierung von LNA direkt neben TO bewirkte nahezu eine Verdopplung der Quantenausbeute (**neu1b**, **neu1c**). Der Einbau zweier LNA-Bausteine bewirkt keine zusätzliche Verbesserung (**neu1i**). Bereits ein Nukleotid Abstand zwischen TO und LNA resultierte in einer Quantenausbeute, welche vergleichbar zu unmodifizierten DNA-FIT-Sonden war. Dies verdeutlicht den lokalen „Verstärkungseffekt“ in Nachbarschaft von TO. Die Responsivität bei Hybridisierung mit komplementärer RNA erwies sich als weitgehend unverändert, da die Zunahme der Quantenausbeute sowohl im Doppelstrang als auch im Einzelstrang beobachtet wurde. Lag das **Ser(TO)** eingebettet zwischen zwei LNAs verringerte sich jedoch die Responsivität, da bereits im Einzelstrang eine dramatische Zunahme der Quantenausbeute auftrat. Zusammenfassend ergab die Verwendung eines einzelnen LNA-Monomers 3', direkt neben **Ser(TO)** die besten Fluoreszenzeigenschaften (**neu1b**).

4.4.2 Vergleich von DNA und LNA-modifizierten FIT-Sonden

Da aus einem einzelnen Sequenzkontext keine allgemeingültige Aussage über die Fluoreszenzeigenschaften getroffen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit das formale „**Ser(TO)**-LNA-Dinukleotid“ auf acht Positionen entlang der *Neuraminidase*-Sequenz platziert (Abbildung 4.4.2B). Auch wenn die Quantenausbeute stets vom Sequenzkontext abhängig ist, konnte gezeigt werden, dass der Einbau von LNA in jedem der acht Fälle eine Steigerung der Quantenausbeute bewirkte. Die Responsivität blieb weitgehend unverändert, sodass eine responsive DNA-Sonde stets auch eine responsive LNA-Sonde ergab. Darüber hinaus resultiert der Einbau von LNA in der Zunahme des TO-Extinktionskoeffizienten um 12-21%, mit einem Maximalwert von ca. 98.000 M⁻¹·cm⁻¹. Im Vergleich zu ungebundenem TO wurde somit eine Zunahme der maximalen Extinktion von 52% erzielt.^[210] Auch wenn der Grund für diesen Anstieg nicht eindeutig belegt werden kann, so scheint es naheliegend, dass die stärker A-typische Duplexstruktur nahe dem **Ser(TO)** die elektronischen Wechselwirkungen des Chromophors mit benachbarten Nukleobasen im Grundzustand verstärkt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Einbau von LNA ebenfalls bei der Verwendung von Ziel-DNA einen dramatischen Effekt auf die Fluoreszenzeigenschaften hat (Tabelle 4.4.1). Während für Ziel-RNA der Einbau von LNA eine Steigerung der Quantenausbeute von 33-110% bewirkte, wurde bei Verwendung von DNA-Target eine Steigerung von 84-293% verzeichnet. Der Grund für den größeren Einfluss liegt vermutlich in der drastischeren Änderung der Duplexgeometrie, die eine B-Typ-Helix beim Einbau von LNA erfährt. Da die Quantenausbeute bei Verwendung von Ziel-DNA deutlich geringer ausfällt als bei Ziel-RNA, ist zusätzlich ein größeres Potential für Verbesserungen vorhanden. LNA-modifizierte Sonden erzielen jedoch auch mit DNA-Target geringere Fluoreszenzanstiege als bei Verwendung von Ziel-RNA. Dennoch war im Allgemeinen eine Zunahme der Responsivität durch LNA-

4. Ergebnisse und Diskussion

Modifizierung zu beobachten, sodass immerhin vier der acht LNA-Sonden eine nützliche Responsivität von $\Phi/\Phi_0 > 4$ aufwiesen (gegenüber zwei der acht DNA-Sonden).

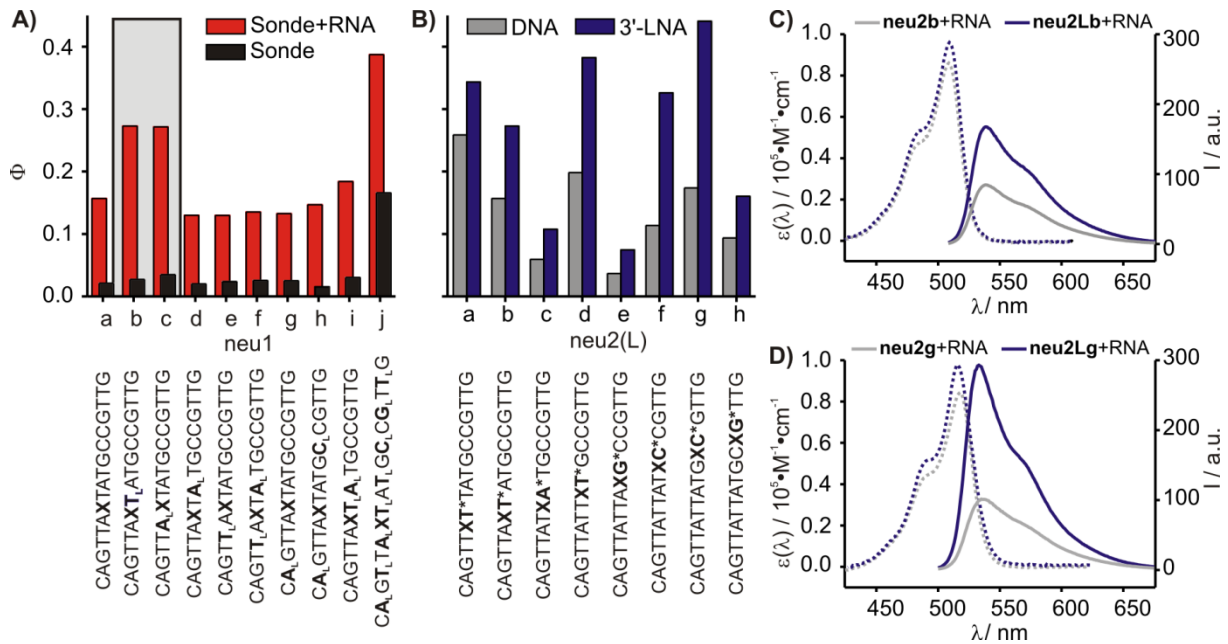


Abbildung 4.4.2: Vergleich der Quantenausbeuten A) vor (schwarz) und nach Hybridisierung mit Ziel-RNA (CAACGGCAUAAUAACUG) (rot), die einfache LNA-Markierung neben TO ist hellgrau hinterlegt; B) im hybridisierten Zustand der DNA-FIT-Sonden (grau) und der LNA-FIT-Sonden (blau) C), D) Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektren im hybridisierten Zustand der DNA-Sonden (grau) und der LNA-Sonden (blau), C) **neu2b** und **neu2Lb**, D) **neu2g** und **neu2Lg**. Bedingungen: 0.5 μ M Sonden und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7) bei 37 °C; λ (ex) = 485 nm, λ (em) = 500-700 nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, Atto520 wurde als Standard zur Bestimmung der Quantenausbeute verwendet. (X = Ser(TO), LNA-Modifikationen sind mit tiefgestelltem L (A) oder mit * markiert (B)).

Tabelle 4.4.1: Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von DNA- und LNA-Sonden bei Hybridisierung mit komplementärer RNA und DNA.

neu	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	Φ_0	Φ (RNA)	Φ/Φ_0 (RNA)	Φ (DNA)	Φ/Φ_0 (DNA)
2a	CAGTTX ^a TATGCCGTTG	0.03	0.26	10.1	0.15	5.9
2La	CAGTTX ^a _L TATGCCGTTG	0.06	0.34	5.9	0.29	4.9
2b	CAGTTA ^a TATGCCGTTG	0.02	0.16	7.4	0.10	4.6
2Lb	CAGTTA ^a _L TATGCCGTTG	0.02	0.27	12.0	0.25	10.9
2c	CAGTTAT ^a XATGCCGTTG	0.04	0.06	1.6	0.06	1.6
2Lc	CAGTTAT ^a X _L TGCCGTTG	0.05	0.11	2.3	0.15	3.1
2d	CAGTTATT ^a XTGCCGTTG	0.05	0.20	4.0	0.10	2.1
2Ld	CAGTTATT ^a X _L TGCCGTTG	0.07	0.38	5.2	0.30	4.1
2e	CAGTTATTAX ^a GCCGTTG	0.04	0.05	1.3	0.04	1.1
2Le	CAGTTATTAX ^a _L GCCGTTG	0.06	0.07	1.3	0.13	2.2
2f	CAGTTATTAT ^a XCCGTTG	0.06	0.16	2.6	0.06	1.0
2Lf	CAGTTATTAT ^a X _L CCGTTG	0.09	0.33	3.8	0.21	2.5
2g	CAGTTATTATG ^a XCGTTG	0.04	0.21	5.7	0.09	2.4
2Lg	CAGTTATTATG ^a X _L CGTTG	0.14	0.44	3.3	0.35	2.6
2h	CAGTTATTATGC ^a XGTTG	0.02	0.12	6.2	0.06	3.3
2Lh	CAGTTATTATGC ^a X _L GTTG	0.02	0.16	6.5	0.11	4.6

Vergleich der Quantenausbeuten bei Hybridisierung mit RNA und Sequenz-analoger DNA (CAACGGCATAA TAACTG). Bedingungen: siehe Abb. 4.4.2. [a] tiefgestelltes „L“ = LNA-Nukleotid.

Zur genaueren Untersuchung des „LNA-Effekts“ auf FIT-Sonden wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Eugeny Ermilov der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Röder (Institut für Physik, HU-

Berlin) Lebenszeiten des angeregten Zustands von TO mittels *TCSPC* (*time-correlated single photon counting*) untersucht (Tabelle 4.4.2). Der Einbau von LNA und die damit einhergehende vergrößerte Quantenausbeute sollten sich ebenfalls in der Gewichtung der Entvölkerungsprozesse des angeregten Zustands äußern. Für ungebundene Sonden wurden vier Abklingprozesse festgestellt, welche sich in 'sehr schnell' (0.04-0.08 ns), 'schnell' (0.13-0.49 ns), 'mittel' (0.99-1.59 ns) und 'langsam' (2.13-4.15 ns) unterteilen lassen. Wie bereits für PNA-basierte Sonden festgestellt wurde, unterbindet die Hybridisierung zu komplementärer RNA schnelle Abklingprozesse, wodurch die Quantenausbeute steigt. Im direkten Vergleich zeigen LNA-markierte Sonden eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von 3.30 ns gegenüber 2.13 ns für DNA-Sonden, was einer Steigerung von 55% entspricht. Bereits DNA-Sonden zeigten eine hybridisierungsinduzierte Verschiebung zu längeren Abklingprozessen, jedoch war für LNA dieser Effekt noch weitaus deutlicher zu beobachten. Besonders die Sonde **neu2Lg** zeigt quasi nur einen langsamen Abklingprozess, was einer idealen Positionierung des TO im Duplex entsprechen sollte. Aufgrund der gesteigerten Quantenausbeute und des großen Extinktionskoeffizients besitzen LNA-markierte FIT-Sonden besonders große Helligkeiten.

Tabelle 4.4.2: Fluoreszenzlebensdauer ausgewählter DNA-FIT-Sonden und der entsprechenden, einfach LNA-markierten Analoga.

neu	Fluoreszenzlebensdauer (τ) / ns (Amplitude / %) ^a				ϵ_{\max}^b	Φ
	sehr schnell	schnell	mittel	langsam		
2b	0.047±0.008 (43)	0.29±0.03 (37)	1.00±0.09 (16)	3.16±0.10 (4)	82260	0.02
2Lb	—	0.23±0.04 (25)	1.22±0.09 (33)	3.15±0.04 (42)	86320	0.02
2b+RNA	0.040±0.010 (42)	0.27±0.04 (37)	1.00±0.10 (15)	3.31±0.09 (6)	92620	0.16
2Lb+RNA	—	—	0.99±0.04 (31)	3.53±0.02 (69)	96350	0.27
2d	0.055±0.010 (37)	0.38±0.06 (34)	1.20±0.20 (23)	2.70±0.20 (6)	79520	0.05
2Ld	—	—	0.99±0.04 (33)	2.85±0.02 (67)	79530	0.07
2d+RNA	0.080±0.040 (20)	0.49±0.10 (41)	1.30±0.30 (29)	3.20±0.30 (10)	95330	0.20
2Ld+RNA	—	—	1.50±0.10 (20)	3.64±0.03 (80)	96250	0.38
2g	0.050±0.020 (28)	0.40±0.07 (37)	1.00±0.20 (29)	2.70±0.10 (6)	83080	0.04
2Lg	—	—	0.94±0.05 (28)	2.96±0.02 (72)	85020	0.14
2g+RNA	—	0.13±0.06 (14)	1.36±0.05 (45)	2.55±0.07 (41)	96100	0.21
2Lg+RNA	—	—	1.00±0.30 (6)	4.15±0.02 (94)	98430	0.44

[a] τ = Fluoreszenzabklingzeit in ns mit relativer Amplitude der exponentiellen Regression in Klammern; [b] molarer Extinktionskoeffizient in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ des Absorptionsmaximums (513 – 518 nm); [c] Quantenausbeute.

4.4.3 Nuklease-resistente FIT-Sonden mit vergrößerter Helligkeit

Die hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften LNA-verstärker FIT-Sonden stellten ideale Voraussetzungen für die RNP-Detektion in lebenden Zellen dar. *Oskar*-mRNA wurde bereits mit Nuklease-resistenten *Molecular Beacons* in lebenden Oozyten visualisiert, jedoch erreichte die Verwendung dieser Sonden in der Bildgebung nicht annähernd den Kontrast und die RNP-Beweglichkeit, welche mittels transgenen *Oskar*-MS2-FP-Systemen erzielt wurde.^[142] Um die Leistungsfähigkeit der LNA-FIT-Sonden zu überprüfen, wurde ein Vergleich zum MS2-GFP-System in lebenden Zellen angestrebt. Eine ähnlich hohe Leistungsfähigkeit könnte es zukünftig erlauben Wildtyp-RNA zu detektieren und somit ggf. auf transgene Spezies zu

verzichten oder RNP-Detektion in Organismen zu ermöglichen, denen transgene Methoden nicht oder nur schwer zugänglich sind. Trotz Allem war davon auszugehen, dass eine einzelne FIT-Sonde nicht die Leistung von mehreren MS2-GFP-Wiederholungseinheiten erreichen kann. Aus diesem Grunde wurden sechs Segmente der *Oskar*-RNA ausgewählt und auf jeweils einer von vier Positionen mittels **Ser(TO)** markiert (Tabelle 4.4.3). Die Sequenzabschnitte wurden entweder durch vorherige Arbeiten mit MBs von Bratu *et al.* als zugänglich *in vivo* befunden(**osk1**, **osk3**)^[142] oder im translatierten Bereich nahe des Stopp-Codons positioniert, da dort keine Interferenz durch RNA-bindende Proteine zu erwarten war.^[230, 231] Die Auswahl des Abschnitts der „**osk6**-Sonden“ wird in einem späteren Teil der Arbeit diskutiert (siehe Kapitel 4.4.5). Bei allen sechs Sequenzabschnitten sollte die vielversprechendste TO-Positionierung als Ausgangspunkt für die Darstellung Nuklease-resistenter, LNA-verstärkter FIT-Sonden dienen.

Tabelle 4.4.3: Sonden zur Detektion von *Oskar*-RNA und Sequenzen der jeweiligen Ziel-RNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	l_0	l	l/l_0	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br^a
osk1-1	GACTT X AGATAATAGGTTTTGGCG	12	46	3.8	0.03	0.09	3.4	3.7
osk1-2	GACTTAAGATA X TAGGTTTTGGCG	9	114	12.5	0.02	0.22	11.7	9.7
osk1-3	GACTTAAGATAATAGGT X TTGGCG	17	100	5.9	0.03	0.18	5.4	7.8
osk1-4	GACTTAAGATAATAGGTT X TGGCG	13	67	5.4	0.03	0.12	4.7	5.2
osk1RNA	⁸³ CGCCAAAACCUAUUAUCUUAAGUC ¹⁰⁶							
osk2-1	AAAAGC X GAAAAGTTTGAAGAGAA	6	37	6.4	0.01	0.08	6.5	3.2
osk2-2	AAAAGCGGA X AGTTTGAAGAGAA	11	34	3.1	0.02	0.08	3.1	3.2
osk2-3	AAAAGCGGAAAAG X TTGAAGAGAA	10	160	16.2	0.02	0.30	14.7	13.5
osk2-4	AAAAGCGGAAAAGT X TGAAGAGAA	31	74	2.4	0.06	0.12	2.3	5.6
osk2RNA	²⁶¹⁵ UUCUCUUCAAACUUUCCGCUUUU ²⁶³⁸							
osk3-1	CTCG X TTCAATAACTTGCAGT	19	176	9.1	0.04	0.31	8.7	14.8
osk3-2	CTCGTTTCA X TAACTTGCAGT	36	98	2.7	0.07	0.18	2.7	8.3
osk3-3	CTCGTTTCAATAA X TTGCAGT	13	72	5.6	0.03	0.16	6.0	6.8
osk3-4	CTCGTTTCAATAAC X TGCAGT	10	82	8.5	0.02	0.16	7.5	6.8
osk3RNA	²²⁰⁹ ACUGCAAGUUAUUGAAACGAG ²²²⁹							
osk4-1	ACCG X TTTTGTTCCAGAAC	17	158	9.1	0.03	0.28	9.2	12.4
osk4-2	ACCGAT X TTGTTCCAGAAC	12	131	10.9	0.02	0.20	9.6	9.1
osk4-3	ACCGATTTT X TTCCAGAAC	14	111	8.2	0.02	0.19	8.7	8.1
osk4-4	ACCGATTTTGTTCC X GAAC	6	29	4.5	0.01	0.05	3.7	2.1
osk4RNA	¹⁴⁴⁴ GUUCUGGAACAAAAUCGGU ¹⁴⁶²							
osk5-1	CGGT X TTCTGGCTTTGGGT	14	130	9.4	0.04	0.25	6.8	10.3
osk5-2	CGGTTTT X TGGCTTTGGGT	14	59	4.1	0.03	0.14	4.2	4.9
osk5-3	CGGTTTTCTGG X TTTGGGT	17	158	9.5	0.04	0.39	9.0	14.6
osk5-4	CGGTTTTCTGGCT X TGGGT	24	108	4.6	0.06	0.19	3.3	8.1
osk5RNA	²¹⁷⁹ ACCCAAAGCCAGAAAACCG ²¹⁹⁷							
osk6-1	GTC X GTTTTTCGATATTCAC	13	56	4.5	0.02	0.10	4.5	4.1
osk6-2	GTCAG X TTTTTCGATATTCAC	13	192	14.6	0.03	0.36	14.5	14.8
osk6-3	GTCAGT X TTTCGATATTCAC	11	145	13.3	0.02	0.22	11.6	9.9
osk6-4	GTCAGTTTTCG X TATTCAC	17	168	9.9	0.03	0.26	8.5	12.1
osk6RNA	⁸⁰⁴ GUGAAUAUCGAAAACUGAC ⁸²²							

Bedingungen: siehe Abb. 4.4.2; [a] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in mmol·cm⁻¹. Die Sonden zur weiteren Untersuchung wurden grau markiert; tiefgestellte Zahlen geben die Position der RNA-Segmente auf der vollständigen *Oskar*-RNA an.

Die Platzierung des **Ser(TO)** innerhalb der ausgewählten Sequenzen erfolgte unter folgenden zwei Kriterien: 1) Basierend auf Ergebnissen bisheriger DNA-FIT-Sonden wurden bestimmte

Sequenzkontexte als vielversprechend für starke Fluoreszenzansteige befunden; 2) sollte eine Vielzahl an unterschiedlichen Sequenzkontexten realisiert werden, um im abschließenden Teil der Arbeit eine detaillierte Analyse der Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften vom Sequenzkontext anfertigen zu können (die Sequenzabhängigkeit der **Ser(TO)**-Fluoreszenz wird in Kapitel 4.6 diskutiert). **Ser(TO)** erwies sich erneut als zuverlässiger Anbindungsmodus, sodass auf jedem Segment mindestens eine Sonde mit einer Fluoreszenzintensivierung von $I/I_0 > 9$ erhalten wurde. Die bevorzugten Positionen für TO (grau markiert in Tabelle 4.4.3) sollten als Vorlage für Nuklease-resistente Sonden verwendet werden. In zahlreichen Arbeiten zu *Antisense*-Anwendungen und *siRNA* wurde die Resistenz von Oligonukleotiden gegenüber Nukleasen eingehend untersucht. Prinzipiell kann sowohl die Sonde selbst z.B. durch Exo- oder Endonukleasen, als auch die RNA-Zielsequenz durch die Induktion der RNase-H-vermittelten Spaltung bei Hybridisierung mit DNA abgebaut werden. Zur Anwendung in lebenden Zellen werden Sonden zumeist durch den vollständigen Ersatz der DNA-Nukleotide durch 2'-O-Me-Ribonukleotide ersetzt. Solche Sonden zeichnen sich durch große Stabilität gegenüber DNasen und die Vermeidung von RNase-H-Spaltung aus. Ebenfalls wurde der erfolgreiche Einsatz von alternierenden DNA/LNA-MBs *in vivo* beschrieben, diese zeigten jedoch, aufgrund der globalen Konformationsänderung, nur vernachlässigbare Verbesserungen der Fluoreszenzeigenschaften.^[145, 146]

Im Folgenden wurde der Einfluss unterschiedliche DNA-Modifikationen auf die Fluoreszenz und die Nuklease-Resistenz von FIT-Sonden überprüft. Neben den unmodifizierten DNA-Sonden (**osk1-2**, **osk2-3** und **osk3-1**) wurde LNA mit einem Abstand von drei bis fünf Nukleotiden entlang der Sondensequenz positioniert (**osk1-2b**, **osk2-3b** und **osk3-1b**), wobei stets eine LNA-Modifikation auf der 3'-Seite des **Ser(TO)** beibehalten wurde. Zusätzlich wurden vollständig 2'-O-Me-modifizierte Sonden (**osk1-2c**, **osk2-3c** und **osk3-1c**) untersucht (Tabelle 4.4.4). Zur Überprüfung der Nukleaseresistenz wurden Sonden-RNA-Komplexe entweder mit RNase-H oder DNase-I inkubiert und das Fluoreszenzsignal über mehrere Stunden beobachtet. Die Abnahme der Emission ist ein Maß für den Abbau von Sonden bzw. Ziel-RNA, da das Chromophor in beiden Fällen nicht länger im Basenstapel interkaliert vorliegt. Die unmodifizierten DNA-FIT-Sonden erwiesen sich erwartungsgemäß als instabil gegenüber DNase-I- und RNase-H-Spaltung. LNA-modifizierte Sonden bewiesen (in Übereinstimmung mit der Literatur) ausreichende Stabilität gegenüber RNase-H-Spaltung, sofern der maximale Abstand zwischen zwei Modifikationen nicht mehr als vier Nukleotide betrug (Abb. 4.4.3C). Hingegen fiel die Stabilität gegenüber DNase-I in der zeitabhängigen Fluoreszenzmessung relativ gering aus (Abb. 4.4.3D). Da für die Beurteilung der Sondenstabilität in lebenden Zellen jeglicher Vergleich fehlte, wurden die LNA-Sonden **osk1-2b**, **osk2-3b** und **osk3-1b** in lebende Oozyten von *Drosophila melanogaster* injiziert. Kurz nach der Injektion zeigte ein helles Signal am posterioren Pol die Anwesenheit von Oskar-RNA an, welches jedoch innerhalb von 45 min nahezu vollständig verblasste (Abb. 4.4.3C, C'). Die 2'-O-Me-modifizierten Sonden erwiesen sich erwartungsgemäß stabil gegenüber DNase-I,

4. Ergebnisse und Diskussion

besaßen jedoch ungünstige Fluoreszenzeigenschaften: die Quantenausbeute im Doppelstrang war gegenüber den DNA-Sonden stark verringert, sodass auch die Responsivität gering ausfiel. Somit eignen sich vollständig 2'-O-Me-modifizierte FIT-Sonden nicht zur Anwendung in der Lebendzell-Bildgebung.

Tabelle 4.4.4: Vergleich von DNA-, LNA- und 2'-O-Me-modifizierten Sonden.

Name	Typ	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	I/I ₀	Φ ₀	Φ	Φ/Φ ₀	Br ^b
osk1-2	DNA	GACTTAAGATA <u>X</u> TAGGTTTTGGCG	12.5	0.02	0.22	11.7	9.7
osk1-2b	LNA	T _L AAG _L ATA <u>X</u> T _L AGGT _L T	14.1	0.03	0.36	13.4	16.4
osk1-2c	2'-O-Me	<u>GACTTAAGATA</u> X <u>TAGGTTTTGGCG</u>	4.5	0.03	0.12	4.2	4.9
osk2-3	DNA	AAAAGCGGAAAAG <u>X</u> TTGAAGAGAA	16.2	0.02	0.30	14.7	13.5
osk2-3b	LNA	G _L CGG _L AAAAG <u>X</u> T _L TGAAG _L	9.6	0.05	0.44	9.8	19.3
osk2-3c	2'-O-Me	<u>AAAAGCGGAAAAG</u> X <u>TTGAAGAGAA</u>	2.8	0.05	0.13	2.7	5.1
osk3-1	DNA	CTCG <u>X</u> TTCAATAACTTGCACT	8.9	0.04	0.31	8.7	14.3
osk3-1b	LNA	C _L TCG <u>X</u> T _L TCAAT _L A	4.1	0.08	0.37	4.4	19.0
osk3-1c	2'-O-Me	<u>CTCG</u> X <u>TTCAATAACTTGCACT</u>	2.6	0.04	0.10	2.8	4.7

Bedingungen: siehe Abb. 4.4.2; [a] unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in mmol·cm⁻¹.

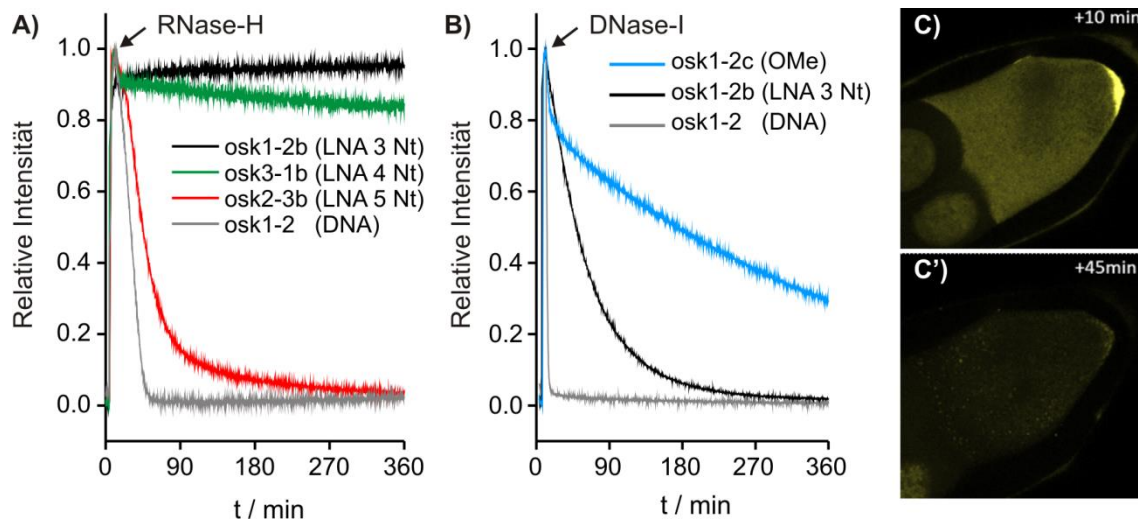


Abbildung 4.4.3: A, B) Fluoreszenzemission ($\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$) der angegebenen Sonden im Doppelstrang während der Behandlung mit RNase-H (A) bzw. DNase-I (B); siehe Kapitel 6.5 für experimentelle Details. C, C') Fluoreszenzmikroskopie der LNA-markierten Sonden **osk1-2b**, **osk2-3b** und **osk3-1b**.

Es war zu anzunehmen, dass analog zum „LNA-Effekt“ der negative Einfluss von 2'-O-Me auf die TO-Emission ebenfalls auf die direkte Nachbarschaft des TO begrenzt ist. Zur ausreichenden Stabilisierung *in vivo* wurde eine möglichst vollständige Modifizierung angestrebt, welche durch die kombinierte Verwendung von LNA und 2'-O-Me erzielt werden könnte. Um eine ideale Kombination beider Modifizierungen zu finden, wurden Sonden basierend auf **osk1-2** mit unterschiedlichen Abständen zwischen TO bzw. dem „TO-LNA-Dinukleotid“ und 2'-O-Me dargestellt (Tabelle 4.4.5) und anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften sowie der Resistenz gegenüber DNase-I untersucht. Die Vermeidung der RNase-H-induzierten Spaltung der Ziel-RNA wurde durch geringe Abstände (maximal 1 Nt) verschiedener Modifizierungen gewährleistet.

4.4. LNA-verstärkte FIT-Sonden zur Detektion von Ribonukleotidpartikeln in lebenden Zellen

Tabelle 4.4.5: Optimierung der LNA- und 2'-O-Me-Markierung von FIT-Sonden für maximale Helligkeit und Stabilität gegenüber DNase-I.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	T _M / °C	Φ ₀	Φ	Φ/Φ ₀	Br ^b	DNase-I t(1/2) / h
osk1-2	GACTTAAGATA X TAGGTTTTGGCG	55	0.02	0.22	11.7	9.7	< 0.5
osk1-2d	TTAAGATA X TAGGTTTTGG	62	0.01	0.11	12.0	5.0	2.7
osk1-2e	TTAAGATA X TAGGTTTTGG	59	0.02	0.18	9.7	8.7	1.7
osk1-2f	TTAAGATA X T _L AGGTTTTGG	67	0.04	0.25	5.5	13.0	> 11
osk1-2g	TTAAGATA X T _L AGGTTTTGG	65	0.04	0.32	9.1	16.4	8.0
osk1	TTAAGATA X T _L AGGTTTTGG	65	0.03	0.34	13.2	16.6	9.2

[a] Unterstrichene Buchstaben = 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in mmol·cm⁻¹. Die vollständigen Absorptions- und Emissionsspektren sind im Anhang (Abb. 9.3.3) gezeigt. Bedingungen zur Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften: siehe Abb. 4.4.2; experimentelle Details zum Verdau mittels DNase-I befinden sich in Abb. 4.4.4.

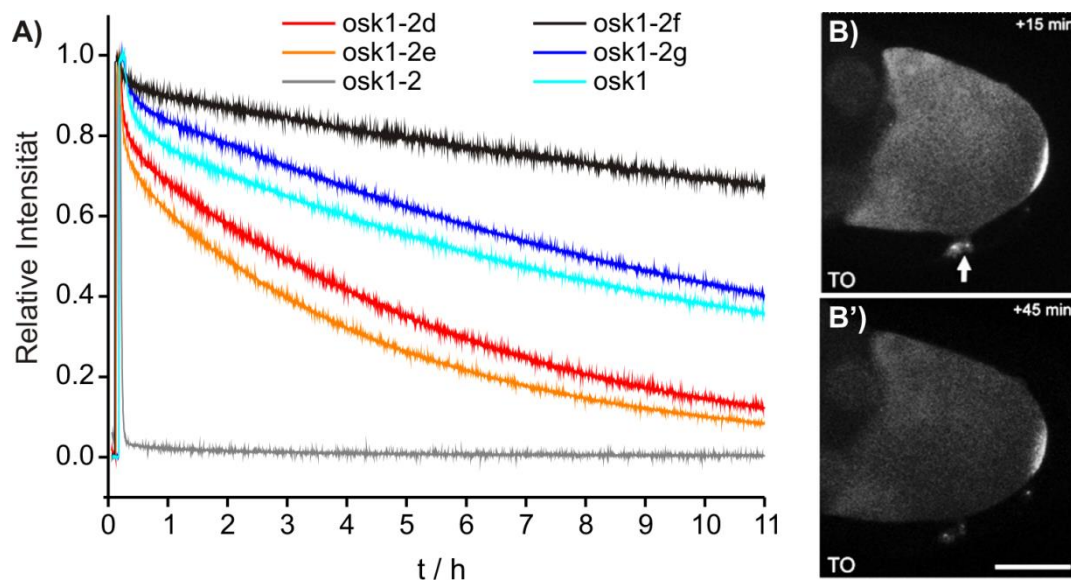


Abbildung 4.4.4: A) Fluoreszenzemission ($\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$) der angegebenen Sonden im Doppelstrang während der Behandlung mit DNase-I; siehe Kapitel 6.5 für experimentelle Details. B-B') Lebendzell-Mikroskopie unter Verwendung Nuklease-resistenter Sonden 15 min (B) und 45 min (B') nach Injektion.

Die vollständig 2'-O-Me-modifizierte Sonde **osk1-2d** zeigte gegenüber der DNA-Sonde (**osk1-2**) eine Halbierung der Quantenausbeute, die Responsivität blieb jedoch überraschenderweise erhalten. Als möglicher Grund kann hier als einziger Unterschied zur vormals untersuchten Sonde **osk1-2c** nur die verringerte Länge (19 Nt vs. 24 Nt) angeführt werden, welche offenbar in einer verminderten Fluoreszenz im Einzelstrang resultierte. Bereits die Einführung eines einzelnen unmodifizierten Nukleotids zwischen **Ser(TO)** und 2'-O-Me (**osk1-2e**) stellt die Quantenausbeute nahezu vollständig wieder her, wodurch sich erneut der lokale Einfluss der Umgebung auf das TO-Chromophor hervorheben lässt. Die Kombination von LNA und 2'-O-Me ohne jegliche DNA-Nukleotide zeigte zwar eine akzeptable Quantenausbeute, jedoch verringerte Responsivität. Die Kombination LNA/2'-O-Me mit einem DNA-Nukleotid Abstand erwies sich als ideal bezüglich der Quantenausbeute und Responsivität (**osk1**). Die Nukleaseresistenz der gezeigten Sonden nahm erwartungsgemäß mit steigender Anzahl an Modifikationen zu, wobei der Einbau von LNA

die deutlichste Vergrößerung der Stabilität bewirkt: Dies erklärt sich durch den Abbau der Sonde zu kürzeren Oligonukleotid-Fragmenten, welche durch die LNA-Modifikation immer noch eine ausreichende Affinität zur Ziel-RNA besitzen. Somit können auch kürzere Fragmente die Interkalation des TO ermöglichen, wodurch über längere Zeiträume eine große Fluoreszenzintensität beobachtet werden konnte. Zusammenfassend konnte durch ein rationales Design der Reporterumgebung sowie die geschickte Kombination aus LNA und 2'-O-Me (1 Nt Abstand) eine helle, responsive und Nuklease-resistente Sonde erhalten werden. Dasselbe 1-Nt-Abstand-Design wurde ohne weitere Optimierung auf weitere FIT-Sonden übertragen.

4.4.4 Oskar-mRNP-Detektion in lebenden Oozyten

Die vielversprechendsten Kandidaten der übrigen DNA-FIT-Sonden zur Detektion von *Oskar*-RNA wurden analog zu **osk1** als 1-Nt-Abstand Sonden dargestellt (Tabelle 4.4.6). Dabei musste beachtet werden, dass die maximale Quantenausbeute des TO im Doppelstrang limitiert ist, sodass für DNA-Sonden mit bereits großer Quantenausbeute ($\Phi > 0.30$) durch den Einbau von LNA nur ein geringer Anstieg der Helligkeit erwartet wurde. Somit wurden nicht zwangsweise die Sonden mit der größten Quantenausbeute als Vorlage für die 1-Nt-Abstand-Sonden verwendet.

Tabelle 4.4.6: 2'-O-Me/LNA 1-Nt-Abstand-FIT-Sonden zur Detektion von *Oskar* *in vivo*.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	I_0	I	I/I_0	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br^b
osk1	<u>TTAAGATA</u> X <u>T_LAGGTTTTGG</u>	15	250	16.9	0.03	0.34	13.2	16.6
osk2	<u>GCGGAAAAG</u> X <u>T_LTGAAGAGA</u>	32	287	8.9	0.05	0.40	7.6	19.7
osk3	<u>CTCG</u> X <u>T_LTCAATAACTTGCA</u>	53	186	4.1	0.10	0.37	3.8	12.9
osk3b	<u>CTCGTTTCAATAAC</u> X <u>T_LGCA</u>	42	189	4.5	0.07	0.28	4.3	14.1
osk4	<u>ACCGAT</u> X <u>T_LTGTTCCAGAAC</u>	32	204	6.4	0.05	0.28	5.8	13.1
osk5	<u>CGGTTTTCTGG</u> X <u>T_LTTGGGT</u>	22	284	12.9	0.05	0.43	8.0	21.2
osk6	<u>GTCAG</u> X <u>T_LTTCGATATTCAC</u>	45	305	6.7	0.07	0.42	6.1	21.1

[a] unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die vollständigen Absorptions- und Emissionsspektren sind im Anhang (Abb. 9.3.4) gezeigt. Bedingungen: siehe Abb. 4.4.2.

Im Vergleich zu den reinen DNA-Sonden wurden stets erhöhte Quantenausbeuten (bis zu 0.43) und Helligkeiten (bis zu $21.2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) festgestellt (siehe Tabelle 4.4.4 und 4.4.6). Die Responsivität mancher Sonden war jedoch gegenüber den DNA-Sonden verringert. Wahrscheinlich würden eine individuelle Optimierung der LNA-Position (5' oder 3') sowie des Abstands zu den 2'-O-Me-Nukleotiden weitere Verbesserungen bringen – um das Sonden Design möglichst einfach und den Synthesaufwand gering zu halten, wurde jedoch auf weitere Optimierung verzichtet. Lediglich für die wenig responsive Sonde **osk3** wurde die nächstbeste TO-Position (**osk3-4**) für eine weitere 1-Nt-Abstand Sonde (**osk3b**) verwendet, jedoch brachte auch dieser Veränderung nur geringfügige Verbesserungen. Auch wenn eine maximale Responsivität wünschenswert ist, zeigten Kummer *et al.*, dass bereits Sonden mit einer Fluoreszenzerhöhung von $I/I_0 = 3.4$ in der Lebendzell-Bildgebung eingesetzt werden können.^[191] Die Anwendbarkeit der DNA-basierten Sonden in lebenden Zellen wurde in

Kooperation mit Dr. Imre Gaspar (Arbeitsgruppe Dr. Anne Ephrussi, EMBL-Heidelberg) überprüft und mit dem etablierten *Oskar*-MS(10x)-GFP-System verglichen. Dazu wurden unterschiedliche Kombinationen und Mengen der Sonden (Tabelle 4.4.6) direkt in das Ooplasma injiziert (Abb. 4.4.5A-A''). Als Maß für die Leistungsfähigkeit der Sonden diente das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR), welches die normalisierte, spezifische Helligkeit der injizierten Sonden wiedergibt, sowie das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SBR), welches den Kontrast der Sonden widerspiegelt (Abb. 4.4.5B). Beide Größen bestimmen die Effizienz der RNP-Detektion. Während eine einzelne Sonde bereits in der Lage, war die Akkumulation von *Oskar* am posterioren Pol anzuzeigen, konnte die Bewegung von RNPs innerhalb der Eikammer nicht eindeutig verfolgt werden. Verbesserte Ergebnisse wurden durch die Verwendung von zwei bis vier Sonden (je 5-45 μM) bei Injektion von 1-4% des Oozyten-Volumens erzielt. Aufgrund der Abhängigkeit der Größe des Oozyten vom Entwicklungsstadium sowie der schnellen Entwicklung, kann keine exakte Sondenkonzentration *in vivo* angegeben werden. Die Verwendung von vier Sonden zeigte dabei im Mittel ähnlich starke Fluoreszenzsignale wie zehn GFP-Moleküle pro *Oskar*-RNA, jedoch waren die SNR und SBR niedriger als jene von *Oskar*-MS2(10x)-GFP. Überschüssiges GFP befindet sich nicht im Ooplasma sondern akkumuliert in den Zellkernen der Schwesterzellen, während ungebundene Sonden weitgehend im Ooplasma verbleiben, wo deren Einzelstrangsignal die SNR und SBR absenkt. Bei Verwendung von lediglich zwei Sonden (**osk1** und **osk2**) und verringerter Konzentration (jeweils 5 μM) wurde das Hintergrundsignal reduziert, sodass geringfügig bessere SBR und SNR als für das MS2(10x)-GFP-System erhalten wurden. Ein detaillierter Vergleich der SNR und SBR unterschiedlicher Sondenkombinationen und -konzentrationen befindet sich im Anhang (siehe Abb. 9.3.5).

Der direkte Vergleich beider Detektionssysteme erfolgte durch die simultane Auslesung von TO neben GFP. Trotz der Verwendung nicht-optimaler Anregungs- und Auslesekanäle, was notwendig wurde um beide Chromophore spektral zu separieren (GFP: $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480\text{--}520 \text{ nm}$, TO: $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535\text{--}625 \text{ nm}$), wurde eine nahezu perfekte Korrelation beider Signale erhalten (Abb. 4.4.5D). Die Bewegung der RNPs wurde mittels computergestützter Analyse verfolgt. Dabei wird über die gewählte Zeitspanne die Bewegung fluoreszenter Partikel verfolgt, sodass die zurückgelegte Wegstrecke, mittlere Geschwindigkeit und Dauer erfasst werden können. Zur Visualisierung der Partikelbewegung bedarf es üblicherweise Videos. Eine alternative, wenngleich weniger geeignete Darstellung ist die Überlagerung mehrerer zeitversetzter Bilder, sodass Bewegungen fluoreszenter Partikel als „Linien“ zu erkennen sind (siehe weiße Pfeile in Abb. 4.4.5). Mit beiden Detektionsmethoden konnten eine vergleichbare Anzahl an Partikeln, Bewegungsgeschwindigkeit und Wegstrecke festgestellt werden (Tabelle 4.4.7). Interessanterweise wurde trotz ähnlicher Parameter und Bildqualität eine Überlappung beider Farbkanäle in nur 40% der Partikelbewegungsfälle festgestellt (weiße Linien Abb. 4.4.5G). Da die Anzahl an detektierten Partikeln nahezu identisch ausfiel, wurden durch die FIT-Sonden einige *Oskar*-MS(10x)-RNAs nicht angefärbt (lila Linien, Abb. 4.4.5G) – möglicherweise

aufgrund der suboptimalen Anregungswellenlänge von TO bei $\lambda(\text{ex}) = 525 \text{ nm}$. Hingegen konnten zahlreiche endogene RNAs von den FIT-Sonden erfasst werden, welche keine MS2-Wiederholungseinheiten tragen und somit nicht mittels GFP detektiert werden konnten (grüne Linien, Abb. 4.4.5G).

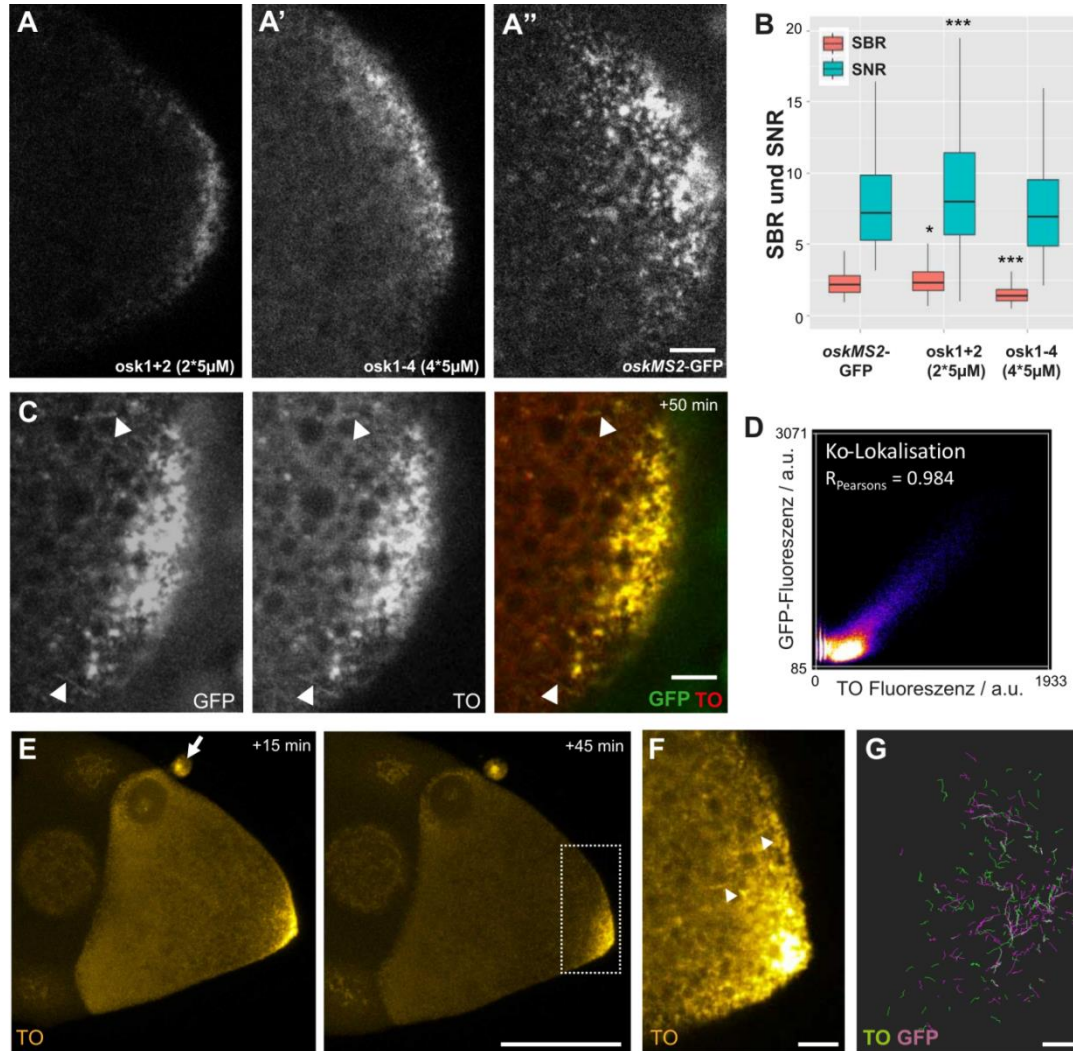


Abbildung 4.4.5: Konfokale Mikroskopie-Bilder von (A-A') Wildtyp (w^{1118})-Oozyten 15 min nach Injektion der FIT-Sonden oder (A'') nicht-injizierte Oozyten, die *oskMS2-GFP* exprimieren. (B) Optische Eigenschaften der PLFs (*particle-like features*, Partikel-ähnliche Objekte). (C und F) Projektion von zehn sukzessiven Bildern von *oskMS2-GFP*-exprimierenden Oozyten bzw. Wildtyp-Oozyten (1.6 Bilder pro Sekunde), in die eine Mischung aus **osk1+2+4** (je $15 \mu\text{M}$) injiziert wurde. Bilder wurden nahe dem posterioren Pol aufgenommen (siehe E). Pfeilköpfe zeigen bewegliche *Oskar*-RNPs an. (D) Kolokalisation von GFP- und TO-Fluoreszenz in Panel C. (E) Wildtyp-Oozyt 15 und 45 min nach der Sonden-Injektion (**osk1+2+4**). (G) Darstellung der *Oskar*-RNP-Trajektorien von sechs Oozyten, die mit Hilfe des *oskMS2-GFP* Systems (lila) und der FIT-Sonden (**osk1+2+4**, grün) gemessen wurden. Überlappende Spuren sind in weiß dargestellt. Bedingungen: (A-A', E, F) $\lambda(\text{ex}) = 514 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 525\text{--}625 \text{ nm}$, (A'') $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{--}600 \text{ nm}$. (C) TO: $\lambda(\text{ex}) = 525 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535\text{--}625 \text{ nm}$, GFP: $\lambda(\text{ex}) = 470 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 480\text{--}520 \text{ nm}$. Die Maßstabsleiste repräsentiert $5 \mu\text{m}$ (A, C, F und G) bzw. $50 \mu\text{m}$ (E).

Ebenfalls in Wildtyp-Oozyten (w^{1118}) konnten *Oskar*-RNPs erfolgreich visualisiert werden. Unter Verwendung von drei bis vier 1-Nt-Abstand-Sonden sowie der optimalen Anregung bei $\lambda(\text{ex}) = 514 \text{ nm}$, wurden eine Verteilung der RNA und Partikelbewegungen gefunden, wie sie in *Oskar*-MS(10x)GFP ohne die zusätzliche Injektion von FIT-Sonden zu sehen ist. Dies belegt eindeutig, dass die Injektion der Sonden und die Hybridisierung mit *Oskar* keinen Einfluss auf

4.4. LNA-verstärkte FIT-Sonden zur Detektion von Ribonukleotidpartikeln in lebenden Zellen

lebende Oozyten und die RNA-Bewegung bzw. Lokalisation ausüben. Somit bestätigten sich die 1-Nt-Abstand FIT-Sonden als geeignetes Werkzeug zur Analyse von RNA in lebenden Zellen (siehe auch Abb. 9.3.6. im Anhang).

Tabelle 4.4.7: Mobilitätsparameter der RNPs bei Visualisierung durch MCP-GFP oder injizierte FIT-Sonden.

Genotyp, Bedingungen, Markierung	<i>oskMS2</i> , nicht-injiziert GFP ^[a]	<i>oskMS2</i> , injiziert, GFP ^[b]	<i>oskMS2</i> , injiziert, TO ^[b]	<i>w</i> ¹¹¹⁸ , injiziert, TO
Anzahl Spuren/Oozyten	133/4	158/6	139/6	238/11
Bewegliche Fraktion / % ^[b]	23.4±2.5	23.1±2.7	22.8±2.5	20.2±2.3
Wegstrecke ^[c] / μm	1.78±1.31	1.82±1.11	1.67±0.98	1.80±1.06
Dauer ^[c] / s	4.80±3.65	5.26±3.66	4.1±3.25*	5.02±3.92
Geschwindigkeit ^[c] / $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.39±0.01	0.38±0.01	0.45±0.01*	0.40±0.01

Eine Mischung aus *osk-1+2+4* (je 15 μM) wurde in Stufe 9 *oskMS2*-GFP- und Wildtyp (*w*¹¹¹⁸)-Oozyten injiziert und nach 35-45 min untersucht. [a] GFP- und TO-Signale derselben *oskMS2*-GFP-Oozyten; [b] Mittel±Standardfehler des Mittel; [c] Mittel±Standardabweichung; *) signifikante Unterschiede ($p<0.05$) im Vergleich zu nicht-injizierten *oskMS2*-GFP-Oozyten.

4.4.5 FIT-Sonden zur Beeinflussung der Lokalisation von Ribonukleotidpartikeln

Während durch die Verwendung der Sonden *osk1-5* kein Einfluss auf die Beweglichkeit und Lokalisation von *Oskar* festgestellt werden konnte, wurde die Sequenz von *osk6* so gewählt, dass durch Hybridisierung der Sonde eine Sekundärstruktur der *Oskar*-mRNA aufgelöst werden sollte. Aus vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Ephrussi zum „*Spliced Oskar Localization Element*“ (SOLE), einer Stamm-Schleifenregion der *Oskar*-mRNA, war bekannt, dass das Entfernen des proximalen Stamms mittels biochemischer Methoden in der verringerten RNP-Beweglichkeit und letztlich in der Fehl-Lokalisation von *Oskar* resultiert. Es wurde diskutiert, dass diese Stamm-Schleifenstruktur in Zusammenhang mit der Bindung von Motorproteinen steht.^[223] Durch das 1-Nt-Abstand-Design besitzt *osk6* eine große Affinität zur Zielsequenz und sollte somit befähigt sein, die Stamm-Schleifen-Struktur aufzubrechen (Abb. 4.4.6C). Das Auflösen des proximalen Stamms sollte dazu führen, dass dieses Motiv nicht länger von RNA-bindenden Proteinen erkannt wird.

Die Injektion einer einzelnen Sonde erzielte erneut keine ausreichende Helligkeit für die zuverlässige Detektion der RNP-Bewegung. Um dennoch den Einfluss einer einzelnen Sonden detailliert untersuchen zu können, wurden die folgenden Experimente an Oozyten durchgeführt, welche *oskMS2*-mCherry exprimieren, sodass die Detektion der RNPs durch das Fluoreszenzprotein mCherry mit ausreichender Helligkeit erfolgte. Gleichzeitig ermöglichte die Verwendung von mCherry das simultane Auslesen beider Reporter ohne spektrale Überlappung.

Der Unterschiedliche Einfluss von *osk6* und *osk3* auf die RNP-Beweglichkeit wurde untersucht. Die Analyse der RNP-Bewegung bei Injektion von *osk3* zeigte ähnliche Parameter wie nicht-injizierte *oskMS2*-mCherry- bzw. *oskMS2*-GFP-Oozyten sowie die übrigen FIT-Sonden (Abb. 4.4.6B+C sowie Tabelle 4.4.7), sodass der Transport von *Oskar* zum posterioren Pol deutlich visualisiert werden konnte. Erneut war die Visualisierung der Partikelbewegung gut in Mikroskopie-Videos zu erkennen, während eine Momentaufnahme Abbildung die

tatsächliche Bewegung kaum wiedergeben kann. Die Injektion von **osk6** resultierte in einer drastisch reduzierten RNP-Beweglichkeit (Abb. 4.4.6B+C): die Wegstrecke und der Anteil an beweglichen RNPs waren deutlich geringer als in allen vorherigen Untersuchungen. Die beobachteten Bewegungsparameter standen dabei im Einklang mit den Ergebnissen der genetischen Entfernung des proximalen Stamms.^[223] Somit stellten sich FIT-Sonden nicht nur als Werkzeug zur Analyse von RNA bzw. RNPs heraus, sondern können – bei geeigneter Wahl der Sondensequenz – dazu benutzt werden, die Lokalisierung und Bewegung von RNA gezielt zu beeinflussen.

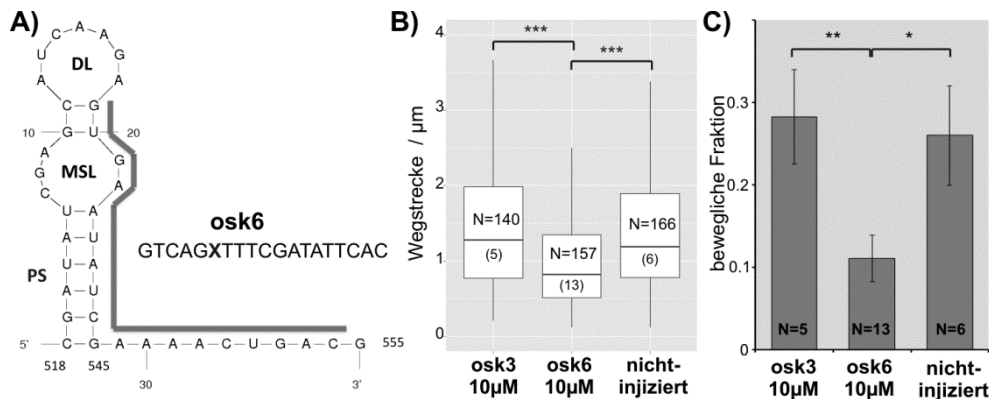


Abbildung 4.4.6: Effekt von **osk6** auf Oskar-mRNP-Beweglichkeit. A) Strukturvorhersage des "Spliced Oskar Localization Element" und das Zielsegment von **osk6**; B) Wegstrecke und C) Fraktion beweglicher Oskar-mRNPs 60 min nach Injektion. *** indiziert $p < 0.001$ eines paarweisen Mann-Whitney-Test (B), * bzw. ** indiziert $p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$, des Student's T-Tests.

4.4.6 Übertrag des LNA-Effekts auf TOJO-markierte Sonden

Abschließend zu diesem Kapitel und in Anlehnung an Kapitel 4.2 sollte geklärt werden, inwiefern sich die Fluoreszenz von JO und dual-markierten Sonden (TOTO oder TOJO) von LNA-beeinflussen lässt. Zum Zeitpunkt der Arbeit standen keine „ultramild-spaltbaren“ 2'-O-Me-Ribonukleotid-Phosphoramidite zur Verfügung, sodass lediglich der Einfluss der LNA untersucht werden konnte. Auch hier musste sich auf die LNA-T-Monomere beschränkt werden, da die Schutzgruppen der anderen Nukleobasen von LNA-Nukleotiden nicht bzw. nicht vollständig unter den milden Abspaltbedingungen entfernt werden würden. Als Modellsequenzen dienten **osk6-2** und **osk6-4**; beide DNA-Sonden lieferten bereits mit TO gute Helligkeiten (12.-14.2 $\text{mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$) und Responsivitäten (8.5-14.5). Der Einbau von LNA in **osk6-2L(TO)** erzielte nur einen geringen Anstieg der Quantenausbeute und der Helligkeit. Der Effekt von LNA ist hier schwach ausgeprägt, da bereits die Vorläufersonde eine sehr große Quantenausbeute (0.36) besitzt (siehe Tabelle 4.4.8). Die doppelt TO-markierte Sonde **osk6-2-4(TOTO)** vereint zwei „gute Positionen“ für **Ser(TO)** und zeigte somit – in Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3 – durch den vergrößerten Extinktionskoeffizienten und die verringerte Quantenausbeute (0.21) eine geringfügig vergrößerte Helligkeit. Durch den Einbau von LNA in **osk6-2L-4L(TOTO)** stieg die Quantenausbeute auf 0.29, sodass eine um 36% gesteigerte Helligkeit erzielt wurde. Der Einbau von LNA stärkt beide TO-Positionen, wodurch Abklingprozesse und Selbst-Quenching verringert wurden. Vergleicht man **osk6-4(JO)** und **osk6-4L(JO)** so wird deutlich, dass der Einbau von LNA kaum einen Einfluss auf

4.4. LNA-verstärkte FIT-Sonden zur Detektion von Ribonukleotidpartikeln in lebenden Zellen

die ohnehin große Helligkeit und Quantenausbeute besitzt. In beiden Fällen wurden helle, jedoch wenig responsive Sonden erhalten.

Tabelle 4.4.8: Fluoreszenzeigenschaften von TO-, TOTO-, JO- und TOJO-Sonden mit und ohne LNA-Modifikation.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO) , Y = Ser(JO)	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br ^b
osk6-2(TO)	GTCAGXTTTCGATATTCAC	0.03	0.36	14.5	14.8
osk6-4(TO)	GTCAGTTTTTCGXATTTCAC	0.03	0.26	8.5	12.1
osk6-2L(TO)	GTCAGXT _L TTTCGATATTCAC	0.05	0.38	7.1	17.4
osk6-2-4(TOTO)	GTCAGXTTTCGXATTTCAC	0.03	0.21	7.4	19.9
osk6-2L-4L(TOTO)	GTCAGXT _L TTTCGX _L ATTTCAC	0.04	0.29	7.9	27.1
osk6-4(JO)	GTCAGTTTTTCGYATTTCAC	0.22	0.80	3.7	31.4
osk6-4L(JO)	GTCAGTTTTTCGY _L ATTTCAC	0.29	0.85	2.9	28.3
osk6-2(TO)-4(JO)	GTCAGXTTTCGYATTTCAC	0.03	0.49	16.7	40.0
osk6-2L(TO)-4(JO)	GTCAGXT _L TTTCGYATTTCAC	0.04	0.56	13.5	44.9
osk6-2L(TO)-4L(JO)	GTCAGXT _L TTTCGY _L ATTTCAC	0.06	0.57	9.6	46.1

Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 2.5 μ M **osk6-RNA**, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), TO und TOTO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500$ -700 nm; JO und TOJO: $\lambda(\text{ex}) = 500$ nm, $\lambda(\text{em}) = 510$ -700 nm; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C. [a] tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Br = Helligkeit in mmol·cm⁻¹.

Die Kombination von TO und JO in **osk6-2(TO)-4(JO)** zeigte abermals eine größere Helligkeit (Br = 40.0 mmol·cm⁻¹) als die einfach-JO-markierte Sonden und eine sehr große Responsivität ($\Phi/\Phi_0 = 16.7$). Da für die Verstärkung der JO-Position durch LNA kein großer Effekt zu erwarten war, wurden auch die dual-markierte Sonde mit nur einer LNA-Modifikation **osk6-2L(TO)-4(JO)** untersucht. Die Quantenausbeute in Einzel- und Doppelstrang stieg geringfügig, sodass die Responsivität im Vergleich zu **osk6-2(TO)-4(JO)** leicht verringert war ($\Phi/\Phi_0 = 13.5$), während die Helligkeit um weitere 12% zunahm. Der zusätzliche Einbau einer weiteren LNA Modifikation neben **Ser(JO)** (**osk6-2L(TO)-4L(JO)**) zeigte keine signifikante Veränderung der Helligkeit, jedoch sank die Responsivität geringfügig ($\Phi/\Phi_0 = 9.6$).

Der Einbau von LNA in JO und TOJO-Sonden bewirkte diesen Ergebnissen zufolge nur geringfügige Verbesserungen der Fluoreszenzeigenschaften. Da der Energietransfer von JO auf TO, aufgrund des Energiegradienten von TO zu JO und der geringen Überlappung von TO-Absorption und JO-Emission, gering ausfällt, kann die Verstärkung der TO-Position nur einen geringen Effekt auf die Helligkeit erzielen. Für TOTO-Sonden konnte hingegen eine signifikante Steigerung der Helligkeit erzielt werden, wodurch die vorherigen Ergebnisse zur Kombination zweier „starker TO-Positionen“ unterstützt werden. Aufgrund der Aggregation zweier TO-Chromophore sollten LNA-verstärkte TOTO-Sonden zukünftig besonders in solchen Fällen Anwendung finden, die durch den Einbau von LNA eine dramatische Verringerung der Responsivität erfahren (z.B. **osk3**).

4.4.7 Diskussion

Zusammenfassend konnte eine neue Strategie für die kombinierte Verbesserung der Helligkeit und Nukleaseresistenz von DNA-FIT-Sonden etabliert werden. Die Optimierung der lokalen Umgebung des Chromophors und die „Verstärkung“ der DNA-Sonde mittels LNA schließt

Wege zur Entvölkerung des angeregten Zustands, wodurch die Quantenausbeute steigt. Im Gegensatz dazu erwiesen sich Sonden mit 2'-O-Me-Nukleotiden in direkter Nachbarschaft zu **Ser(TO)** als dunkel und wenig responsiv. Die Kombination von **Ser(TO)** mit 3'-LNA, einem DNA-Nukleotid Abstand und die übrige Modifizierung durch 2'-O-Me-RNA konnte eine ideale Kombination aus gesteigerter Sonden-Performance und Nukleaseresistenz erzielen. Dieses Sondendesign konnte auf andere Sondensequenzen übertragen werden und bestätigte seine Leistungsfähigkeit.^[232]

Interessanterweise wurde für *ECHO*-Sonden ein umgekehrter Effekt beobachtet. Auch wenn die Helligkeit der Sonden nicht quantifiziert wurde, so bestätigen publizierte Daten, dass 2'-O-Me-RNA-modifizierte *ECHO*-Sonden vergrößerte Fluoreszenzintensität und Responsivität lieferten. Der Einbau von LNA in *ECHO*-Sonden zeigte hingegen eine Verringerung der Fluoreszenzintensität.^[181] Für *Molecular Beacons* wurde LNA erfolgreich in den sogenannten *Tiny Molecular Beacons* eingesetzt, um die Stamm- und Schleifenstruktur deutlich zu verkürzten. Die vergrößerte Affinität zur Zielsequenz durch LNA-Nukleotide ermöglichte hocheffiziente, verkürzte Sonden.^[145, 146] Für die meisten Untersuchungen in lebenden Zellen wurden jedoch 2'-O-Me modifizierte MBs verwendet - ebenfalls in Untersuchungen zur Detektion von *Oskar*-mRNA.^[142] Im Rahmen solcher Untersuchungen zeigten Mhlanga *et al.* die Verwendung von vier verschiedenen MBs entlang der *Oskar*-mRNA und beobachteten den Transport von großen RNPs mit mehreren hundert mRNA-Molekülen.^[233] Diese riesigen Aggregate zeigten eine etwa zehnfach reduzierte Beweglichkeit gegenüber den Untersuchungen mittels transgener Detektionsmethoden. Solch große Aggregate wurden bisher nur unter zellulären Stressbedingungen beobachtet. Dadurch wird deutlich, dass über die Auswahl der Zielsequenz hinaus, die Bedingungen der RNA-Detektion sorgfältig ausgewählt und optimiert werden müssen.

Die Verwendung von zwei bis vier „1-Nt-Abstand FIT-Sonden“ ermöglichte die Visualisierung der *Oskar*-RNP-Dynamik und lieferte Motilitätsparameter welche vergleichbar zur Detektion mit dem transgenen *oskMS2*-GFP-System waren.^[232] Zusätzlich stellte sich heraus, dass man durch die Auswahl der Sondensequenz die Motilität der RNPs gezielt herabsetzen kann, wodurch sich FIT-Sonden über die Möglichkeit zur Detektion hinaus als wertvolles Werkzeug für weitere biologische Anwendungen empfehlen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass mehrfach-markierte FIT-Sonden ebenfalls vom „LNA-Effekt“ profitieren. Die durch LNA vergrößerte Helligkeit dual-markierter TOTO- bzw. TOJO-Sonden könnte die Anzahl der notwendigen Sonden für die hocheffiziente RNA- bzw. RNP-Detektion weiter verringern.

4.5 qFIT – Sonden zur RNA-Quantifizierung

Die Untersuchung von Genexpressionsleveln und Lokalisation von RNA trägt maßgeblich zu unserem Verständnis von zellulären Prozessen bei. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die DNA-Sequenzierung,^[10, 11] die quantitative PCR^[17] und das *Northern-Blotting*.^[234] Diese Methoden ermöglichen Abschätzung der RNA-Mengen ganzer Zellpopulationen. Obwohl neuere Errungenschaften, z.B. in der PCR, sogar die Quantifizierung RNA einzelner Zellen erlauben,^[235] können diese Methoden keine Aussage über die Lokalisation der RNA liefern. Eine der wichtigsten Entwicklungen zur Fluoreszenz-basierten Quantifizierung von RNA in Zellen, die sogenannte *Single Molecule Fluorescence in-situ Hybridization (smFISH)*, basiert auf Arbeiten von Singer *et al.*^[120] und Raj *et al.*^[121] Die Grundlage bildet eine Vielzahl Fluorophormarkierter, nicht-responsiver Sonden, welche gegen die gleiche RNA gerichtet sind. Durch die Beladung einer RNA mit bis zu 48 Fluorophoren wurde es möglich, ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal pro RNA zu erzeugen, sodass einzelne RNA-Moleküle detektiert werden konnten (siehe auch Kap. 2.4). Im Gegensatz dazu sind wenige einfach-markierte, responsive Hybridisierungssonden nicht hell genug, um einzelne RNA-Moleküle zu detektieren. Folglich wird mit diesen Methoden in der Regel eine Akkumulation mehrerer RNAs (z.B. als RNPs) detektiert. Eine große RNA-Dichte führt bei *smFISH* jedoch zu einer Sättigung des Detektorsignals, sodass hoch exprimierte RNAs, wie sie z.B. bei der Expression von viraler RNA oder Embryonalentwicklung vorkommen, nur begrenzt quantifiziert werden können.

Bei Verwendung responsiver Sonden zur RNA-Quantifizierung stellt sich das Problem, dass nicht unterschieden werden kann, ob das detektierte Signal durch eine geringe Menge an hybridisierter Sonde hervorgerufen wird oder durch eine größere Anzahl an ungebundenen Sonden bzw. durch eine Mischungen beider Spezies. Bei den sogenannten *Ratiometric Bimolecular Beacons (RBMBs)* wurde das Konzept der MBs durch die einseitige Verlängerung der Stammregion sowie der terminalen Anbringung des *Quenchers* und eines zweiten, unabhängigen Reporters auf einem, zur verlängerten Stammregion komplementären, Oligonukleotid erweitert (vgl. Abb. 2.4.2). Durch den zweiten Farbkanal konnten gebundene sowie ungebundene Sonden detektiert werden.^[150] Die Kombination dieser Sonden mit transgenen Wiederholungseinheiten als Zielsequenz ermöglichte die Detektion einzelner RNA-Moleküle in lebenden Zellen.^[152] Die Verwendung von Wiederholungseinheiten vermindert zwar die Komplexität des Sondendesigns, jedoch ist diese Methode auf transgene RNA beschränkt und kann somit keine Aussage über endogene RNA-Mengen liefern.

Im Rahmen dieser Arbeiten sollte ein einfaches, auf FIT-Sonden basierendes Konzept zur Quantifizierung von Wildtyp-RNA entwickelt werden (qFIT), welches in Ergänzung zum *smFISH*, die Quantifizierung größerer RNA-Konzentrationen zulässt. Die Kombination von DNA-basierten FIT-Sonden mit einem terminalen, spektral unabhängigen Reporter würde die Möglichkeit bieten, den Hybridisierungszustand der Sonde als Ratio zwischen TO und dem zweiten Reporter zu bestimmen (Abb. 4.5.1). Durch die einfache, interne Markierung mittels **Ser(TO)** stehen freie Enden zur Konjugation mit weiteren Reportern zur Verfügung, wodurch ein einfaches Sondendesign durch terminale Anbringung eines zweiten Reporters

gewährleistet werden sollte. Bereits in PNA-basierten, stammlosen *Molecular Beacons* konnte die Kombination aus TO und einem terminalen Akzeptor gezeigt werden.^[194, 195] Das hydrophobe RNA-Rückgrat bedingt jedoch eine verminderte Löslichkeit und Aggregation der Sonden, wodurch es zur Löschung beider Chromophore kommt. Durch die Verwendung von DNA und einem Farbstoff, welcher mit TO nur minimal spektral überlappt, sollte es möglich sein beide Chromophore voneinander zu entkoppeln. Als Reporter wurde der positiv geladene Nah-Infrarot(NIR)-Farbstoff Cyanin-7 (Cy7) verwendet, welcher sich neben seinem Absorptions- und Emissionsbereich zusätzlich durch seine große Helligkeit auszeichnet. Für Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie musste bedacht werden, dass beide Farbstoffe durch konventionelle Filter- bzw. Laseranregung detektiert werden müssen. Um minimale Interferenz beider Farbstoffe zu gewährleisten, sollten unterschiedliche Abstände beider Reporter untersucht werden.

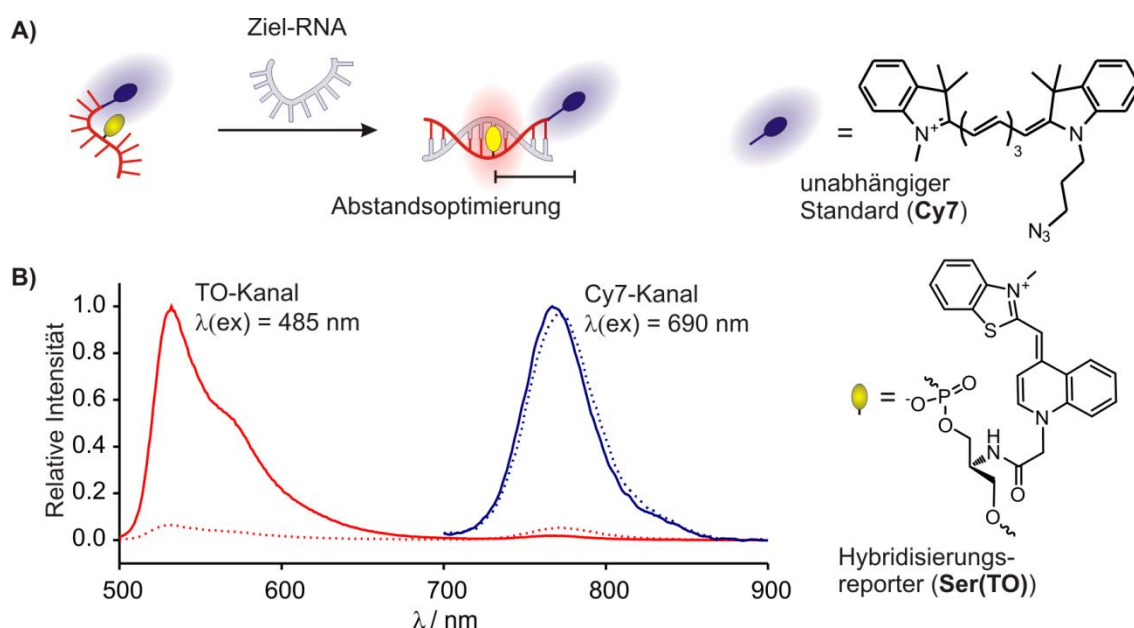


Abbildung 4.5.1: A) Schematische Darstellung des Konzepts der quantitativen FIT-Sonden (qFIT) und Strukturen beider Reporter; B) exemplarische Emissionsspektren von TO (rot) und Cy7 (blau) vor (gestrichelt) und nach der Hybridisierung mit komplementärer RNA.

4.5.1 Synthese der qFIT-Sonden

Die Verwendung des Cy7 bedingt dessen post-DNA-synthetische Anbindung an die FIT-Sonden in Lösung, da die Heptamethinbrücke keine ausreichende Stabilität gegenüber den basischen Abspaltbedingungen nach der DNA-Synthese aufweist. Als orthogonale Konjugationsmethode von Oligonukleotid und Farbstoff wurde die Kupfer-katalysierte [2+3]-dipolare Cycloaddition von Alkin und Azid verwendet.^[236] Zur Synthese des Azid-funktionalisierten Cy7 (Cy7-N₃, **50**) wurde 2,3,3-Trimethylindol (**44**) mit 1,4-Dibrombutan aktyliert (**45**) und anschließend mittels Natriumazid substituiert (Abb. 4.5.2). Das Polymethingerüst **48** wurde nach einer literaturbekannten Prozedur aus *N*,2,3,3-Tetramethylindoliumiodid (**47**) und dem C₅-Baustein Glutacondianilhydrochlorid (**49**) erhalten.^[237] Die abschließende Verknüpfung beider Molekülhälften lieferte Cy7-N₃ (**50**) in 57%-iger Ausbeute.

Zur Verknüpfung von **Cy7-N₃** mit FIT-Sonden wurden diese am 5'-Ende mit Butin-1-ol-Phosphoramidit (**51**) funktionalisiert. Nach der DNA-Synthese der Sonde wurden die 5'-Alkin-modifizierten Oligonukleotide mittels HPLC-RP-UV/Vis gereinigt (siehe Abb. 4.5.3).

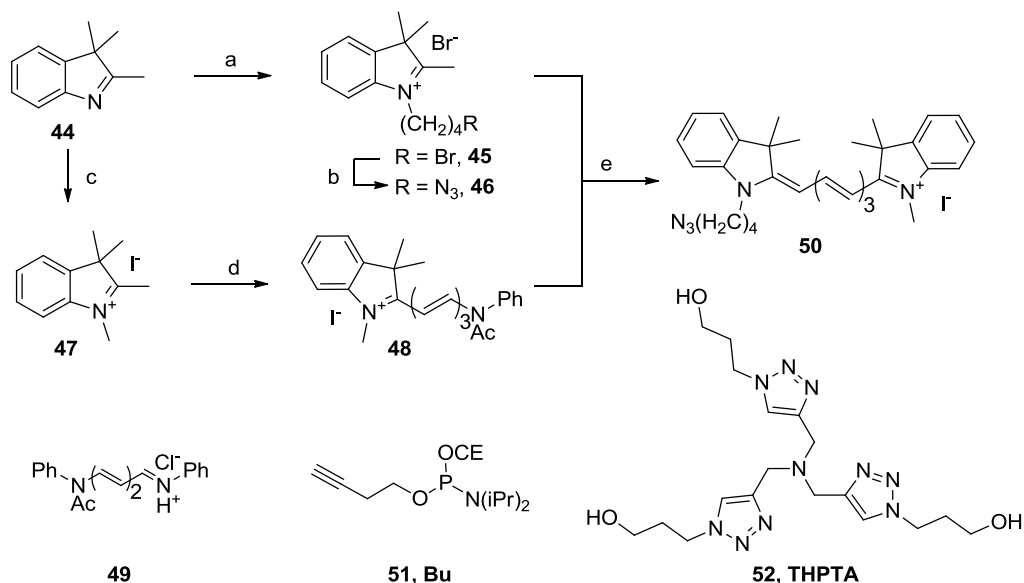


Abbildung 4.5.2: Synthese von Cy7-azid und Struktur des Alkinphosphoramidits sowie des Kupferliganden; a) 1,4-Dibrombutan, DMF, 42%; b) NaN₃, DMF, 80%; c) MeI, Nitromethan, 95%; d) **49**, Ac₂O, Pyridin, 90%; e) Pyridin, 57%.

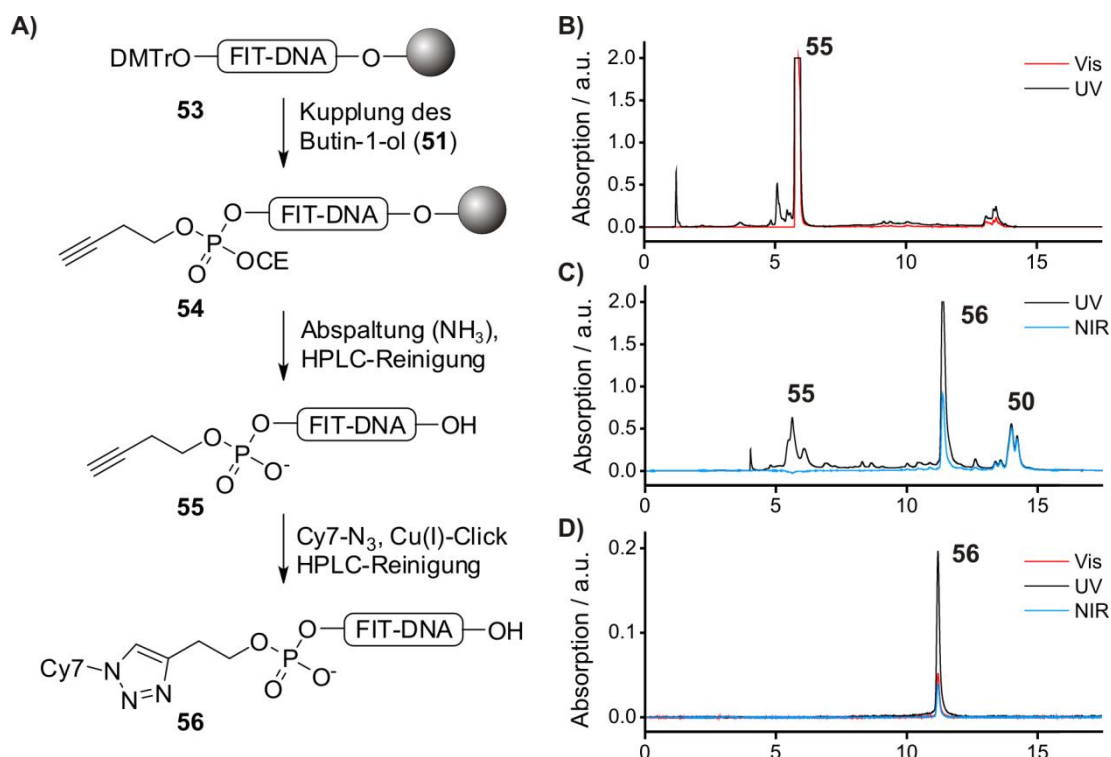


Abbildung 4.5.3: A) Schematische Darstellung der terminalen DNA-Modifizierung mittels Click-Reaktion; B-D) HPLC-RP-UV/Vis-Chromatogramme, B) der präparativen Reinigung des Butinol-Oligonukleotids **osk-c-Bu**; C) der Click-Reaktion mit Cy7-Azid und D) die finale Analyse des Produkts **osk-c-Bu-Cy7**.

Die Verknüpfung von **Cy7-N₃** mit den 5'-Butin-markierten Sonden erfolgte, aufgrund der mäßigen Löslichkeit des Farbstoffs, in einer Mischung aus Wasser und DMSO. Die

Oligonukleotide wurden in Puffer (100 mM TRIS, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl₂, pH 8) vorgelegt, mit THPTA (**52**, Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin) als Kupfer-Ligand sowie Kupfer(II)sulfat versetzt und **Cy7-N₃** (in DMSO gelöst) zugegeben. Anschließend wurde Cu²⁺ durch die Zugabe von Ascorbinsäure zu Cu⁺ reduziert und die Reaktionsmischung für 2-3 Stunden bei 55 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Oligonukleotide mittels *i*PrOH gefällt, die Pellets zweimal mit *i*PrOH gewaschen, wodurch bereits ein Großteil der überschüssigen Reagenzien entfernt wurde. Anschließend wurden die Sonden in Wasser gelöst, mittels Spritzenfilter von unlöslichen Bestandteilen befreit und per HPLC-RP-UV/Vis gereinigt.

4.5.2 Charakterisierung der qFIT-Sonden

Zur Charakterisierung der qFIT-Sonden wurden diese mit den 5'-unmodifizierten Vorläufersonden verglichen. Dabei wurde sowohl die TO-Emission ($\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}900 \text{ nm}$) sowie die Cy7-Emission ($\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 700\text{-}900 \text{ nm}$) untersucht. Die Anregung bei 690 nm ist nicht ideal für Cy7, jedoch erlaubte diese Wellenlänge die Aufnahme der vollständigen Emissionskurven vor bzw. nach Hybridisierung mit komplementärer RNA. Die TO-Fluoreszenz wurde wie bereits in Kapitel 4.1 anhand ihrer Emission bei $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$ charakterisiert.

Tabelle 4.5.1: Sequenzen und Fluoreszenzeigenschaften der qFIT-Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	T _M / °C	I ₀	TO I	I/I ₀	Cy7 I/I ₀
osk-a	GACTTXAGATAATAGGTTTTGGCG	56	24	82	3.5	-
osk-b	GACTTAAGATAXTAGGTTTTGGCG	55	20	182	9.3	-
osk-c	GACTTAAGATAATAGGTXTTGGCG	55	37	173	4.7	-
osk-a-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTTXAGATAATAGGTTTTGGCG	57	5	17	3.1	1.0
osk-b-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTTAAGATAXTAGGTTTTGGCG	56	5	83	15.4	1.1
osk-c-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTTAAGATAATAGGTXTTGGCG	56	11	166	15.2	1.1

Bedingungen: T_M: 1 μM Sonde und Ziel-RNA in PBS; Fluoreszenz: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA (CGCCAAAACCUAUUAUCUUAAGUC), bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7) bei 25 °C; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 774 \text{ nm}$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

Der Einbau von Cy7 in DNA-FIT-Sonden bewirkte eine verminderte Emission des TO im Einzelstrang, verglichen mit den konventionellen FIT-Sonden (**osk-a-c**). Es war anzunehmen, dass ein Energietransfer von TO zu Cy7 stattfindet, obwohl die Überlappung zwischen TO-Emission und Cy7-Absorption minimal ist (siehe Abb. 4.5.4). In Abwesenheit von Ziel-RNA könnten die beiden Chromophore zur Minimierung der hydrophoben Oberfläche in räumliche Nähe kommen, wodurch ebenfalls eine Stoßlöschung im Einzelstrang möglich wäre. Da die Cy7-Emission jedoch vor und nach der Hybridisierung weitgehend unverändert blieb, ist als Hauptursache für die verringerte TO-Emission im Einzelstrang der FRET von TO auf Cy7 zu vermuten.

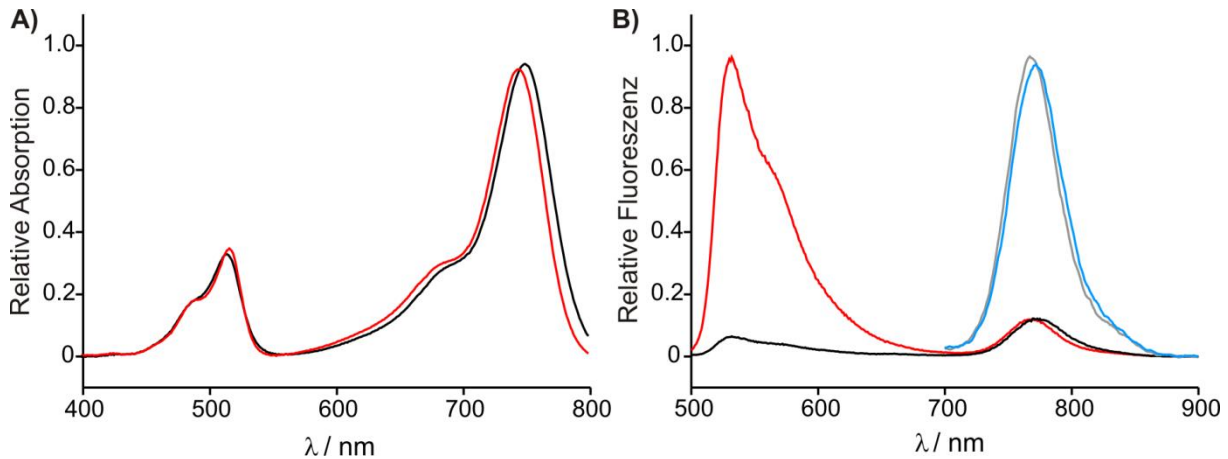


Abbildung 4.5.4: A) Absorption von **Osk-3_Bu-Cy7** vor (schwarz) bzw. nach Zugabe von komplementärer RNA (rot); B) Emission von **Osk-3_Bu-Cy7**. TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}900 \text{ nm}$, vor (schwarz) bzw. nach Zugabe von komplementärer RNA (rot); Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 700\text{-}900 \text{ nm}$ vor (grau) bzw. nach Zugabe von komplementärer RNA (blau). Bedingungen: $0.5 \mu\text{M}$ Sonden und 5 \AA q . RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl , $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7) bei 25°C ; slit(ex) = 5 nm , slit(em) = 5 nm .

Bei Hybridisierung mit komplementärer RNA wird der Einfluss des Abstands zwischen TO und Cy7 deutlich. Ein kurzer Abstand (5 nt , **osk-a-Bu-Cy7**) bewirkte geringe Fluoreszenzintensität, sodass ebenfalls die Responsivität geringer ausfiel als jene der unmodifizierten Sonde **osk-a**. Bei größeren Abständen wurden dank der geringen Emission im Einzelstrang starke Fluoreszenzanstiege ($I/I_0 \approx 15$) erhalten. Jedoch war erst beim größten Abstand (17 Nt) die Intensität des TO vergleichbar mit jener der Vorläufersonde (**osk-c**), während bei 11 Nt Abstand nur 45% der Signalintensität von **osk-b** erhalten wurden (vgl. Tabelle 4.5.1). Ebenfalls im Doppelstrang war ein verbleibender Energietransfer von TO zu Cy7 erkennbar, welcher mit steigendem Abstand geringer ausfiel. Die Emission des Cy7 war bei jedem Abstand nahezu unabhängig vom Hybridisierungszustand, wodurch die grundlegende Funktionsfähigkeit des Konzepts bestätigt wurde. Die Analyse der Schmelztemperaturen zeigte keinen destabilisierenden Einfluss der terminalen Modifizierung (siehe Tabelle 4.5.1).

Tabelle 4.5.2: Fluoreszenzeigenschaften der DNA- und LNA-modifizierten FIT-Sonden mit internem Standard.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	I_0	TO		Cy7	
			I	I/I_0	I/I_0	I/I_0
osk-d-Bu-Cy7	Cy7-Bu-CGGTTTTCTGGXTTGGGT	4	67	16.1	1.2	1.2
osk-dL-Bu-Cy7	Cy7-Bu-CGGTTTTCTGGXT _L TTGGGT	5	86	18.4	1.2	1.2
osk-d-RNA	₂₁₇₉ ACCCAAAGCCAGAAAACCG ₂₁₉₇					
osk-e-Bu-Cy7	Cy7-Bu-AAAAGCGGAAAAGXTTGAAGA	8	108	13.2	1.1	1.1
osk-eL-Bu-Cy7	Cy7-Bu-AAAAGCGGAAAAGXT _L TGAAGA	17	127	7.4	1.0	1.0
osk-e-RNA	₂₆₁₅ UUCUCUUCAAACUUUUCGCUUUU ₂₆₃₈					

Bedingungen: $0.5 \mu\text{M}$ Sonde und 5 \AA q . Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl , $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7) bei 25°C ; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 774 \text{ nm}$; slit(ex) = 5 nm , slit(em) = 5 nm .

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und zum Vergleich von Sonden mit und ohne LNA-Modifizierung wurden zwei *Oskar*-Sonden aus Kapitel 4.4 als Vorlage genommen (**osk-d** entspricht **osk5-3**, **osk-e** entspricht **osk2-3**, siehe auch Tabelle 4.5.2). Die Einzelstrang-Fluoreszenz aller Sonden erschien sehr gering, sodass starke Fluoreszenzanstiege erhalten

wurden. Die LNA-Modifizierung zeigte erneut eine gesteigerte Fluoreszenzintensität, wenngleich der Effekt gegenüber den DNA-FIT-Sonden geringer ausfiel. Als Ursache liegt erneut der geringe Energietransfer von TO zu Cy7 nahe. Bei allen untersuchten Sonden blieb die Cy7-Emission vor und nach der Hybridisierung nahezu unverändert.

Für alle Sonden-Ziel-RNA-Kombinationen konnte, trotz des verstärkten Energietransfers bei kurzen Abständen, ein unverändertes Cy7-Signal festgestellt werden. Zur genaueren Untersuchung der Emission bei unterschiedlichen Hybridisierungsgraden wurden ebenfalls die Integrale der Fluoreszenzkurven betrachtet (Abb. 4.5.5B), welche erneut den Anstieg der TO-Emission und, mit einer maximalen Abweichung von 3% (Mittelwert: 3158 a.u.; Standardabweichung: 44 a.u.), ein nahezu konstantes Cy7-Signal bestätigten. Ähnliche Experimente konnten erfolgreich mit den übrigen Sonden sowie unter Verwendung einer weiteren Sonden in Kombination mit Ziel-DNA durchgeführt werden (siehe Anhang Abb. 9.4.1).

osk-c-Bu-Cy7: GACTTAAGATAATAGGT~~X~~TTGGCG Ziel-RNA: CGCCAAAACCUAUUAUCUUAAGUC

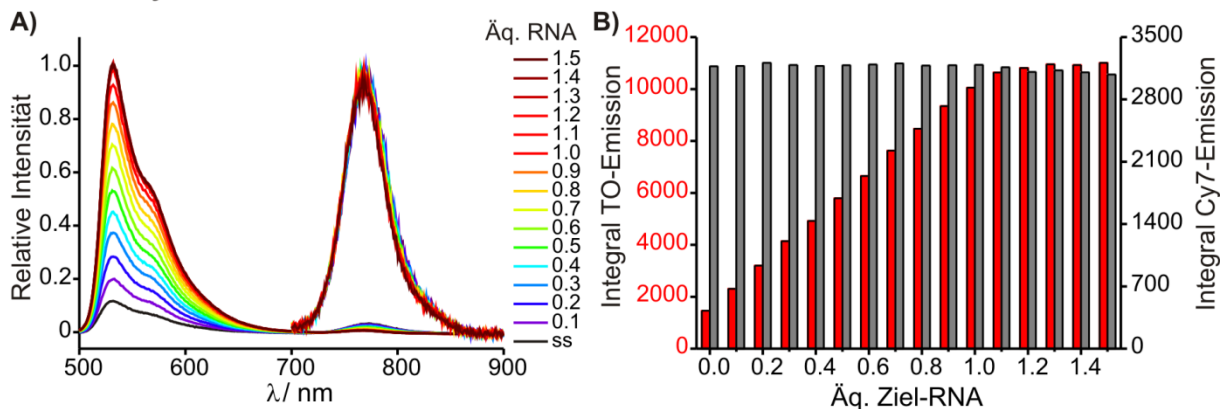


Abbildung 4.5.5: Titrationsexperimente von **osk-c-Bu-Cy7**; A) Emissionsspektren von TO und Cy7 bei schrittweiser Zugabe von Ziel-RNA; B) Integral der Fluoreszenzemission von TO (rot) und Cy7 (grau). Bedingungen: 200 pmol **osk-c-Bu-Cy7**; in PBS, Zugabe von Ziel-Nukleinsäure in 0.1 Äq. Schritten (20 pmol), im Bereich: 0.0-1.5 Äq.). TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500-900 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 700-900 \text{ nm}$.

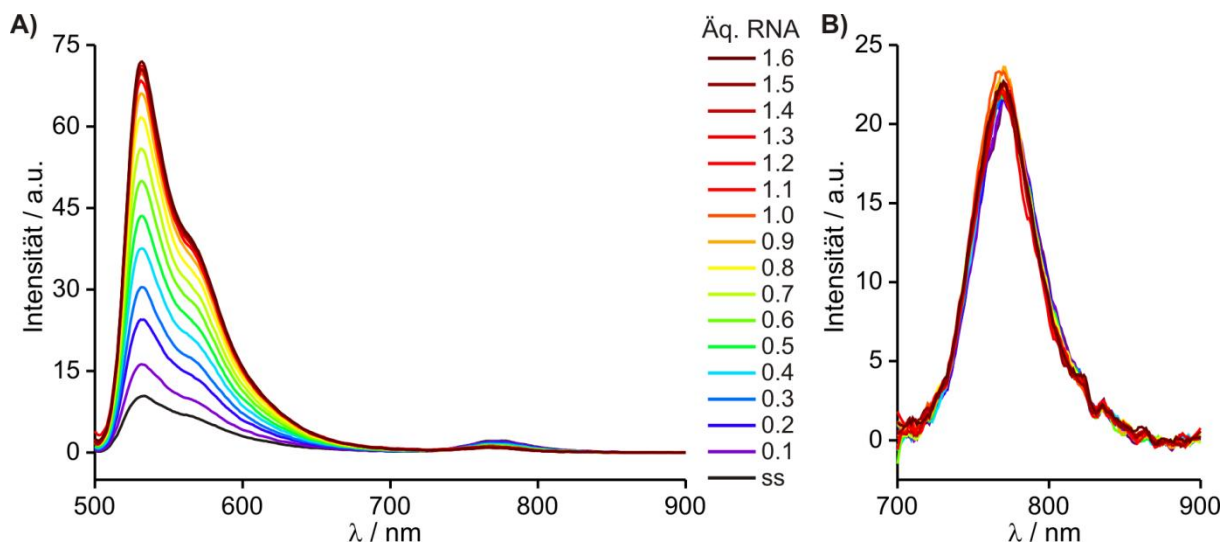


Abbildung 4.5.6: A) TO- und B) Cy7-Emissionsspektren von **osk-c-Bu-Cy7** in Zelllysat bei schrittweiser Zugabe von Ziel-RNA. Bedingungen: 200 pmol Sonde 1 mL Zelllysat (10^6 MDCK-Zellen/mL), Zugabe von Ziel-RNA in 0.1 Äq. Schritten (20 pmol, Bereich: 0.0-1.6 Äq.). TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500-700 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 700-900 \text{ nm}$;

Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit des Konzepts in biologischer Matrix untersucht. Es war vorstellbar, dass der unpolare Farbstoff unspezifische Bindung oder Wechselwirkungen mit zellulären Bestandteilen eingeht. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit in biologischer Matrix wurde die Sonde **osk-c** (0.1 μ M) in trübem Zelllysats von 10^6 MDCK-Zellen/mL untersucht. Trotz des hohen Hintergrundsignals des Lysats offenbarte die schrittweise Zugabe von komplementärer RNA einen kontinuierlichen Anstieg der TO-Fluoreszenz bis zu 1.0 Äq. RNA und konstante TO-Fluoreszenz bei Anwesenheit von ≥ 1.0 Äq. (Abb. 4.5.5A). Erneut blieb die Cy7-Fluoreszenz über den gesamten Bereich (0.0-1.6 Äq.) nahezu konstant (Abb. 4.5.5B), sodass optimale Ausgangsbedingungen für die Verwendung der Sonden in *FISH*-Experimenten gewährleistet waren.

4.5.3 Lokalisierung und Quantifizierung von *Oskar*-mRNA

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln diente *Oskar*-mRNA als Exempel zur biologischen Anwendung der qFIT-Sonden. Die Mikroskopieexperimente und Datenanalyse wurden von Dr. Imre Gaspar (Arbeitsgruppe von Dr. Anne Ephrussi, EMBL-Heidelberg) durchgeführt. *Oskar* akkumuliert während der Oogenese am posterioren Pol des entwickelnden Oozyten und kann, aufgrund der lokal hohen Konzentration dieser RNA am Zielort, mit den bisher etablierten Methoden nur unzureichenden quantifiziert werden. Analog zu den Untersuchungen mit TOJO-Sonden (Kapitel 4.2) wurden die qFIT-Sonden zur waschfreien *FISH* verwendet und die Emissionen von TO sowie Cy7 aufgezeichnet (siehe Abb. 4.5.7).

Jeder Pixel (x,y) der Mikroskopaufnahmen gibt die TO-Fluoreszenzintensität als Summe der Konzentration ($c_{x,y}$) von ungebundener ($c_{ss,x,y}$) und gebundener Sonde ($c_{ds,x,y}$) wieder (Gleichung 1). Das waschfreie *FISH*-Protokoll ermöglichte die einfache externe Kalibrierung der TO- und Cy7-Fluoreszenz. Dazu wurde in zellfreier Umgebung *in vitro* transkribierte *Oskar*-RNA in unterschiedlicher Konzentration und Stöchiometrie mit Sonde (bzw. Mischungen verschiedener Sonden) unter dem Mikroskop gemessen (Abb. 4.5.8), sodass jedem Wert der Cy7-Emission eine entsprechende Sondenkonzentration zugeordnet werden konnte. In Abwesenheit von RNA ($c_{ds} = 0$) ergibt sich daraus die molare Fluoreszenz ungebundener Sonde ($K_{ss,0}$) sowie bei Verwendung von ≥ 1 Äq. RNA die molare Fluoreszenz hybridisierter Sonde ($K_{ds,0}$).

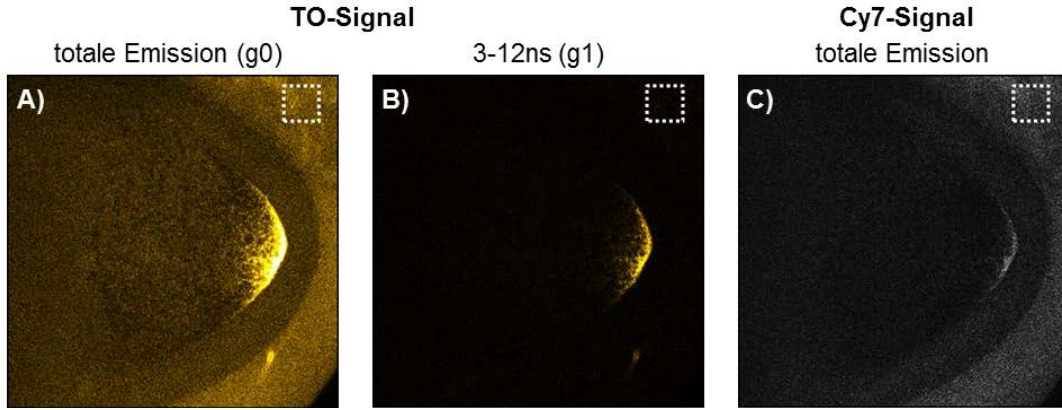


Abbildung 4.5.7: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der waschfreien *in-situ* Hybridisierung mit den Sonden **osk-c-Bu-Cy7**, **osk-d-Bu-Cy7** und **osk-e-Bu-Cy7**, (jeweils 0.5 μM). A) vollständige TO-Emission, B) zeitverzögerte TO-Emission (3-12 ns); C) Cy7-Emission. Bedingungen: jeweils 0.5 μM Sonde in Hybridisierungspuffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , Zusatz von 1% SDS, 15% Ethylencarbonat (A), pH 7.7).

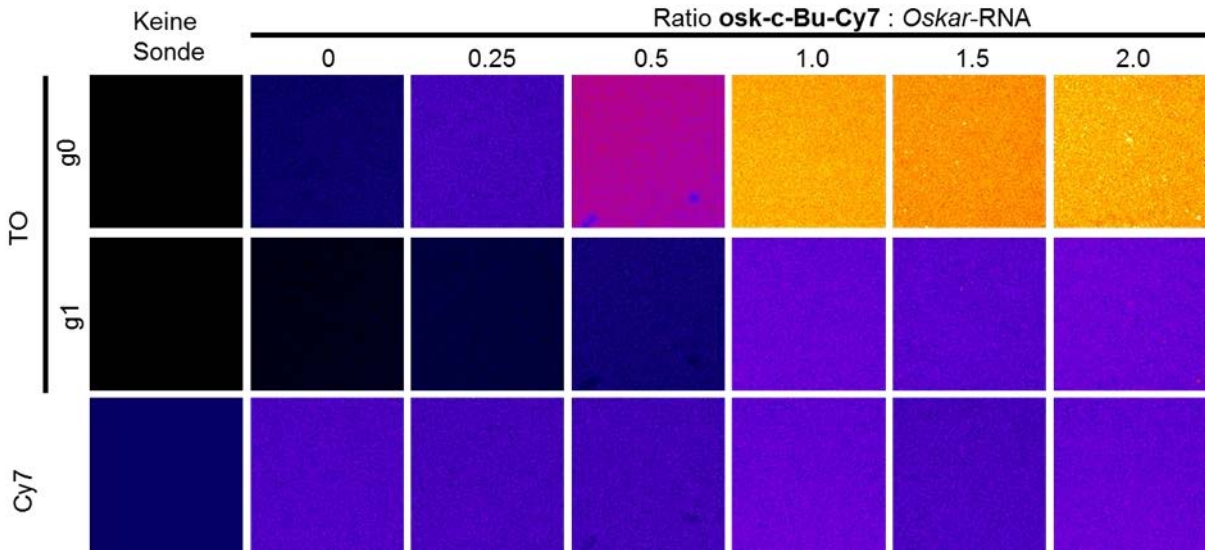


Abbildung 4.5.8: Externe Kalibrierung der Sonde **osk-c-Bu-Cy7** (0.6 μM) bzw. Sonden-RNA-Mischung mittels Fluoreszenzmikroskopie der TO-Emission g0 (vollständig, ohne Zeitverzögerung) und g1 (Zeitspanne von 3-12 ns der Fluoreszenzlebensdauer) sowie der Cy7-Emission. Die Farbskalierung erfolgte automatisch anhand der minimalen und maximalen detektierten Fluoreszenzemission.

Das TO-Signal kann somit durch die molaren Fluoreszenzen ($K_{ss,0}$ und $K_{ds,0}$) sowie die jeweilige Konzentration an gebundener und ungebundener Sonde beschrieben werden (Gleichung 2). Zusätzlich beschreibt das Verhältnis der molaren Fluoreszenz den Signalanstieg bei Hybridisierung (R), welcher für **osk-c-Bu-Cy7**, in guter Übereinstimmung mit den Messungen *in vitro*, als $R = 11.4$ ermittelt wurde. Diese externe Kalibrierung ist, sofern die Mikroskopeinstellungen beibehalten werden, nur einmal notwendig.

$$(1) \quad c_{x,y} = c_{ss,x,y} + c_{ds,x,y}$$

$$(2) \quad I_{x,y,0} = c_{ss,x,y} * K_{ss,0} + c_{ds,x,y} * K_{ds,0}$$

$$(3) \quad R = \frac{K_{ds,0}}{K_{ss,0}}$$

Unter Verwendung dieser Formeln und der Annahme, dass die extern ermittelten Werte für $K_{ds,0}$ und $K_{ss,0}$ sowie R über die gesamte Probe identisch sind, konnte eine sogenannte *Heatmap* der Konzentration an freier, hybridisierter und gesamter Sonde erstellt werden. Dieses grobe, sehr einfache Modell zur Berechnung der Sonden- und RNA-Konzentration mittels qFIT lieferte sehr geringe Konzentrationswerte und ließ optische Unterschiede (Brechungsindex, Schichtdicke, Streuung) der zu untersuchenden Probe außer Acht (siehe auch Anhang, Abb.8.4.2).

Bei der exakten Bestimmung der RNA-Konzentration ist zu beachten, dass Oozyten keine homogene Probe darstellen, wodurch die Analyse erschwert wird. Neben der unterschiedlichen Höhe bzw. Form der Oozyten gibt es auch unvorhersehbare lokale Unterschiede hinsichtlich der Streuung und des Brechungsindex, welche z.B. durch den Proteingehalt, die Dichte und das Entwicklungsstadium beeinflusst werden. Um trotz dieser Einflüsse eine valide Aussage über die Konzentration der RNA treffen zu können, ist eine interne Kalibrierung nötig. Die Fluoreszenzlebensdauer ist unabhängig von allen optischen Parametern, da sie allein von intrinsischen Eigenschaften der Elektronen im angeregten Zustand abhängig ist. Da der hybridisierungsinduzierte Fluoreszenzanstieg von FIT-Sonden ebenfalls mit einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer verknüpft ist (vgl. Kapitel 4.4.2), sollte sich diese Eigenschaft zur internen Kalibrierung verwenden lassen. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten zweier unterschiedlicher, temporale Fraktionen der Fluoreszenz, die gesamte Lebensdauer (I_0) und 3-12 ns (I_1) miteinander verglichen (die tiefgestellte „1“ bezeichnet Daten, welche die Fluoreszenzlebensdauer von 3-12 ns erfassen, siehe Abb. 4.5.7A-B). Für die ungebundene Sonde war die Ratio (R) beider Intensitäten (Gleichung 4) relativ groß, da ungebundene Sonden nur sehr geringe Intensitäten im Zeitfenster von 3-12 ns aufwiesen und erreichte ein Minimum ($R_{ds,min}$) von 3.56 bei vollständiger Hybridisierung.

$$(4) \quad R_{ds} = \frac{I_{x,y,0}}{I_{x,y,1}} \rightarrow R_{ds,min} = \frac{K_{ds,0}}{K_{ds,1}} = 3.56 \quad \text{für } c_{RNA}/c_{Sonde} \geq 1$$

Analog zu Formel (2) kann für das Auslesen der Fluoreszenzintensität > 3 ns die folgende Gleichung (5) aufgestellt werden und unter Verwendung von Gleichung 4 umgestellt werden:

$$(5) \quad I_{x,y,1} = c_{ss,x,y} * K_{ss,1} + c_{ds,x,y} * K_{ds,1} = c_{ss,x,y} * K_{ss,1} + c_{ds,x,y} * \frac{K_{ds,0}}{R_{ds,min}}$$

Im Sonderfall des zellfreien Hintergrunds lassen sich die Werte für $K_{ss,1}$, $K_{ss,0}$ sowie die Ratio R_{ss} bestimmen. Mit diesen Werten lassen sich innerhalb des Oozyten die Werte für $c_{ss,x,y}$, $c_{ds,x,y}$ und $K_{ds,0}$ nach folgenden Gleichungen berechnen:

$$(6) \quad c_{ss,x,y} = \frac{I_{x,y,0} - R_{ds,min} * I_{x,y,1}}{K_{ss,0} - \frac{R_{ds,min}}{R_{ss}} * K_{ss,0}} \rightarrow c_{ds,x,y} = c_{x,y} - c_{ss,x,y}$$

$$(7) \quad K_{ds,0} = \frac{I_{x,y,0} - K_{ss,0} * c_{ss,x,y}}{c_{ds,x,y}}$$

Mit Hilfe dieser Berechnungen konnte der Wert für $K_{ds,0}$ innerhalb des Oozyten intern kalibriert werden, um optischen Unterschieden innerhalb der Probe gerecht zu werden. Die Bestimmung der Konzentration durch diese Methode ist exemplarisch in Abb. 4.5.7C und Abb. 4.5.9A'-D' dargestellt. Für $K_{ds,0}$ wurden allerdings stets kleinere Werte ermittelt als während

der Kalbrierung im zellfreien Hintergrund, sodass das Verhältnis der molaren Fluoreszenz (R , laut Gleichung 3) lediglich im Bereich von $R = 3-5$ und nicht im Bereich von $R = 11.4$ lag. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es aufgrund von Streuung zu einem Verlust an Photonen bei Anregung bzw. Emission kommt. Da bisher lediglich der Wert für $K_{ds,0}$ nicht jedoch der Wert für $K_{ss,0}$ individuell pro Pixel kalibriert wurde, erschien die Konzentration des Einzelstrangs überbewertet. Um zu berücksichtigen, dass auch ungebundene Sonden der Streuung bzw. veränderten optischen Eigenschaften unterliegen, wurde in einem iterativen Zyklus mittels der Formeln 6, 7 und 3 ebenfalls der Wert von $K_{ss,0}$ und anschließend $K_{ds,0}$ individuell neu berechnet (Abb. 4.5.9). Der Zyklus wurde beendet, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt wurde: 1) die Veränderung der Wertes für $K_{ds,0}$ beträgt weniger als 0.5% zwischen zwei Zyklen oder 2) die Konzentration des Einzelstrangs überstieg 90% der gesamten Sondenkonzentration, sodass die Änderung des Wertes von $K_{ds,0}$ nicht länger signifikant war. Die Verwendung der adaptiven Bestimmung der Parameter $K_{ss,0}$ und $K_{ds,0}$ resultierte in der Reduzierung des Signals in den Epithelzellen, wo *Oskar* nicht lokalisiert (vgl. Tabelle 4.5.3). In der Eikammer sowie den umgebenden Schwesterzellen stieg die Konzentration an hybridisierter Sonde geringfügig, während der Anteil ungebundener Sonde im Ooplasma geringer erschien (siehe Tabelle 4.5.3). Alle Berechnungen konnten in ein Skript eingebettet automatisch für jeden Bildpunkt nach der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Dadurch können die Gesamtkonzentration der Sonde, der Anteil an ungebundener und hybridisierter Sonden sowie die Werte der molaren Fluoreszenz für jeden Pixel in einer sogenannten *Heatmap* dargestellt und die Konzentration der *Oskar*-mRNA im gesamten Oozyten analysiert werden.

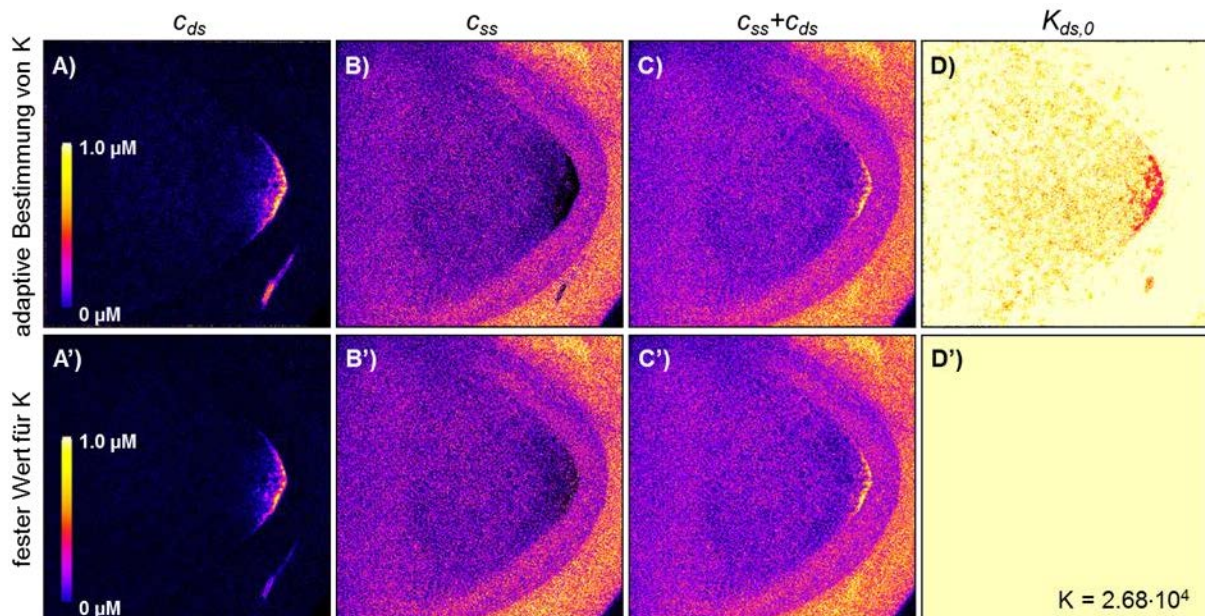


Abbildung 4.5.9: Ergebnisse der Konzentrationsberechnungen pro Pixel nach der waschfreien *in-situ* Hybridisierung bei kombinierter Verwendung von *osk-c-Bu-Cy7*, *osk-d-Bu-Cy7* und *osk-e-Bu-Cy7* unter Verwendung der A-D) adaptiven Methode zur Bestimmung von $K_{ss,0}$ und $K_{ds,0}$ pro Pixel im Vergleich zur (Iteration der Gleichungen 6, 7 und 3) A'-D') Verwendung des konstanten Wertes für $K_{ds,0}$ (alleinige Verwendung der Gleichung 6). Die einzelnen Abbildungen geben jeweils die Konzentration entsprechend der Färbung an. Bedingungen: siehe Abb. 4.5.7.

4.5. qFIT – Sonden zur RNA-Quantifizierung

Tabelle 4.5.3: Konzentrationsbestimmung von *Oskar*-RNA.

Experiment	Region ^a	Konzentration / μM				KF ^b	# <i>Oskar</i>	<i>osk</i> (max)/ Voxel
		C _{ds}	C _{ss}	c	C _{ds} (max)			
adaptiv	Oozyt	0.036	0.174	0.211	2.215	0.059	3093415	51.99
	FC	0.019	0.303	0.322	0.342			
	Korr.	0.024	0.174	0.211	2.084			
Fester Wert für K	Oozyt	0.027	0.184	0.211	1.428	0.056	1933384	33.55
	FC	0.018	0.304	0.322	0.175			
	Korr.	0.015	0.184	0.211	1.345			

[a] Oozyt = mittlere Konzentration im Oozyten. FC = mittlere Konzentration in den Follikelzellen, Korr. = mittlere korrigierte Werte; [b] KF = Korrekturfaktor. Zur Berechnung dienten folgende Werte als Grundlage: Totales Volumen (Oozyt): 214035.7 μm^3 , Voxel(FC): 647233, Voxel(Oozyt): 5166550 Voxel(Gesamt) = 5813783. Bedingungen: siehe Abb. 4.5.7.

Mit Hilfe der hier entwickelten Methode wurde es möglich die Konzentration an gebundener und ungebundener Sonde über die gesamte Probe zu bestimmen, sodass anhand des Volumens pro Pixel (Voxel) eine Bestimmung der Gesamtmenge an *Oskar*-RNA möglich wurde. Zusätzlich würden sich ausgewählte Bereiche quantifizieren lassen (z.B. *Oskar* am posterioren Pol). Im Vergleich der adaptiven Methode mit den globalen, festen Werten der molaren Fluoreszenz wird deutlich, dass die individuelle Berechnung dieser Werte einen dramatischen Einfluss auf die Quantifizierung besitzen und ca. ein Drittel mehr an *Oskar*-RNA durch die adaptive Methode identifiziert werden konnte.

4.5.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeiten konnte die Erweiterung des FIT-Sondenkonzepts zur Quantifizierung von RNA in Zellen bzw. Geweben gezeigt werden. Dazu wurden konventionelle FIT-Sonden am 5'-Ende mit einer Alkin-Funktion versehen und mit dem unabhängigen Fluoreszenzreporter Cy7 verknüpft. Ein geringer Energietransfer und möglicherweise eine Aggregation der beiden Farbstoffe bewirkt – analog den Beobachten bei TOJO-Sonden – eine Verringerung der TO-Emission im Einzelstrang. Bei Hybridisierung mit komplementärer RNA oder DNA wird ein starker Fluoreszenzanstieg erhalten. Somit erwiesen sich qFIT-Sonden als weniger anspruchsvoll hinsichtlich der Positionierung des **Ser(TO)** innerhalb der Sondensequenz. Da ein großer Abstand zwischen Cy7 und **Ser(TO)** in vergrößerter TO-Emission resultiert, sollten zukünftige Sonden einen möglichst großen Abstand (> 17 Nt) besitzen. Unabhängig von der TO-Emissionsintensität blieb das Cy7-Signal vor und nach der Hybridisierung weitgehend unverändert, sodass nach externer Kalibrierung ein Rückschluss auf die Sondenkonzentration ermöglicht wurde.

Das Konzept der quantitativen FIT-Sonden konnte in Oozyten von *Drosophila melanogaster* zur Quantifizierung von *Oskar*-mRNA verwendet werden. Um optische Unterschiede (z.B. Schichtdicke, Streuung und Hintergrundsignal) innerhalb des Gewebes auszugleichen, wurde die verlängerte Fluoreszenzlebensdauer hybridisierter FIT-Sonden ausgenutzt. Eine besondere Stärke dieser Methode zur RNA-Quantifizierung liegt in der Toleranz großer RNA-Konzentrationen, wie sie im Fall von *Oskar* am posterioren Pol während der Oogenese

auftreten. Zwar kann mit quantitativen FIT-Sonden keine Einzelmolekül-Detektion erzielt werden, wie es beispielsweise mit *smFISH*-Sonden (48 lineare, fluoreszente Oligonukleotide) erzielt wird. Jedoch würde die große Anzahl an Fluorophoren vermutlich zu einer Sättigung des Detektorsignals im Bereich des posterioren Pols führen. Somit sollten qFIT-Sonden als komplementäres Werkzeug zum *smFISH* angesehen werden. Während letztere besonders zur Bestimmung von sehr geringen RNA-Mengen herangezogen werden, bieten sich qFIT-Sonden für hoch-exprimierte Ziel-RNAs an. Das einfache Sondendesign und das zeitsparende, waschfreie *FISH*-Protokoll gewährleisten zusammen mit der von Dr. Imre Gasper entwickelten, automatisierten Bildanalyse eine einfache und schnelle Methode zur RNA-Quantifizierung. Zu beachten gilt, dass bereits eine einzelne Sondensequenz die Quantifizierung von RNA in der Eikammer ermöglichte. Die Verwendung von drei Sonden in niedrigen Konzentrationen verringerte das Hintergrundsignal ungebundener Sonde in den Follikelzellen. Um die dargestellte Methode unabhängig zu validieren, befassen sich aktuelle Arbeiten mit dem Vergleich von qFIT und *smFISH*.

4.6 Synthese und Charakterisierung neuer Fluorophore für DNA-FIT-Sonden

In den vorhergehenden Kapiteln wurden bereits die notwendigen Kriterien für den erfolgreichen Einsatz von FIT-Sonden diskutiert und dabei ein Hauptaugenmerk auf die Verbesserung der Helligkeit gelegt. Jedoch gestaltete es sich bisher schwierig, weitere effiziente Chromophore für FIT-Sonden zu etablieren. Beispielsweise zeigten BO und JO meist nur geringe Responsivitäten. Obwohl sich die bisher erzielten Fluoreszenzanstiege bei geringem Aufwand der Positionsoptimierung für **Ser(TO)** als nützlich in der RNA-Detektion *in vitro* und *in vivo* erwiesen, wäre es wünschenswert das Hintergrundsignal in biologischen Anwendungen weiter zu reduzieren und somit die Leistungsfähigkeit in der Bildgebung zu steigern. Eine Emission im roten Wellenlängenbereich würde zudem in zahlreichen zellulären Experimenten die starke Autofluoreszenz bei kürzeren Wellenlängen umgehen,^[200, 201] wodurch die Leistungsfähigkeit der Sonden weiter gesteigert würde.

Komplementäre Farbstoffe sollten es ermöglichen verschiedene Ziel-RNAs in räumlicher und zeitlicher Abhängigkeit in Kollokalisationsexperimenten zu untersuchen. Ferner würde auch die simultane Verwendung von fluoreszenten Fusionsproteinen und FIT-Sonden erleichtert, da sich das sehr häufig verwendete GFP nur unter suboptimalen Bedingungen getrennt von TO auslesen lässt (siehe Kapitel 4.4). Eine größere Auswahl an Farbkanälen für FIT-Sonden, würde simultane Detektionsexperimente von z.B. mehreren RNAs und verschiedenen fluoreszenten Fusionsproteinen ermöglichen.

Gleichermaßen ist für alle Reporter von entscheidender Bedeutung eine genaue Kenntnis des Zusammenhangs zwischen SONDENSEQUENZ und Fluoreszenzeigenschaften zu gewinnen. Dies würde das Design weiterer FIT-Sonden vereinfachen. Neue Reporter für FIT-Sonden sollten idealerweise die folgenden Kriterien erfüllen: 1) eine große Responsivität in zahlreichen Sequenzumgebungen; 2) eine große Helligkeit zur effizienten Unterscheidung von zellulärem Hintergrund; 3) eine im Vergleich zu TO rot-verschobene Emission sowie 4) keine signifikante spektrale Überlappung der Chromophore, sodass eigene Farbkanäle zur Mehrfarbdetektion erhalten werden.

4.6.1 Auswahl und Darstellung neuer Farbstoffe

Eine Vorhersage welcher Farbstoff große Leistungsfähigkeit in FIT-Sonden liefert, war anhand seiner Struktur kaum möglich. Jedoch ließen sich in der Literatur zahlreiche asymmetrische Cyaninfarbstoffe finden, welche Responsivität bei Hybridisierung zeigen. Die meisten Sondenkonzepten beruhen jedoch auf der aggregationsinduzierten Löschung zweier Chromophore im Einzelstrang sowie deren räumlicher Trennung und ggf. Interkalation bei Hybridisierung, um einen Fluoreszenzanstieg bzw. Farbwechsel zu erzeugen (vgl. Kapitel 2.4). Die Umgebungssensitivität dieser Chromophore war somit nicht zwangsläufig gegeben. Ebenfalls berichteten Okamoto *et al.* zahlreiche Farbstoffe im roten bis nahen IR-Bereich, welche verlängerte Cyaninbrücken (C₃ bis C₅) enthalten. Es war davon auszugehen, dass die Größe der Farbstoffe einen kritischen Faktor für die erzwungene Interkalation darstellt, da zu große Farbstoffe vermutlich nicht in den Duplex interkalieren können, ohne die Struktur zu

stören. Orientierende Untersuchungen mit MO (Thiazolopyridin), welches bereits in PNA-FIT-Sonden untersucht wurde,^[190] zeigte eine unzureichende (Photo)Stabilität, sodass eine stetige Zersetzung des Chromophors beobachtet wurde. Neben dem Verlust der Absorption im Vis-Bereich, wurde über das Zersetzungsprodukt durch massenspektrometrische Analyse Hinweise auf den Bindungsbruch an der Methinbrücke gefunden. MO eignete sich somit nicht für Untersuchungen in DNA-FIT-Sonden, sodass alternative Farbstoffe gefunden werden mussten. Es wurden drei Kandidaten identifiziert, welche rotverschoben zu TO emittieren und nur geringe spektrale Überlappung mit der Emission bzw. Absorption der übrigen Chromophoren zeigten (Abb. 4.6.1). Zusammen mit BO (5) und TO (8) decken sie nahezu den kompletten Vis-Bereich ab. Eine Kombination dieser fünf Farbstoffe sollte die individuelle Auslesung jedes Chromophors auf einem eigenen Farbkanal und somit eine Fünffarbdetektion ermöglichen.

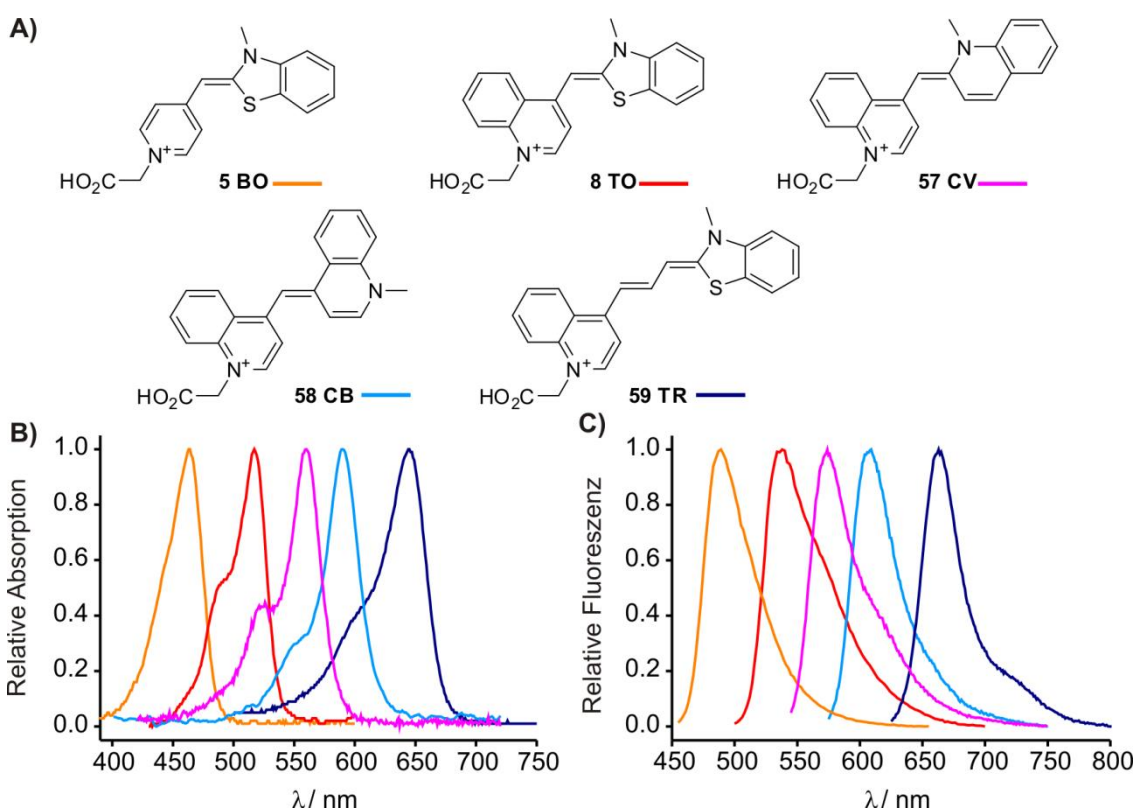


Abbildung 4.6.1: A) Strukturen der zu untersuchenden Cyaninfarbstoffe; B) repräsentative Absorption- und C) Emissionsspektren der Chromophore.

4'-2-verknüpftes (CV, Chinolinviolett, 57) bzw. 4'-4-verknüpftes (CB, Chinolinblau, 58) „Bis-chinolin“ wurden von Asseline *et al.* zur terminalen Markierung von DNA-Oligonukleotiden verwendet.^[238] Wenngleich diese Studien keine responsiven Sonden ergaben, so erschienen Sie durch ihre Größe sowie ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu TO als geeignet. Ein strukturell ähnlicher Farbstoff, welcher oberhalb von 650 nm emittiert, konnte nicht gefunden werden. Jedoch wurde das C₃-Homolog des TO, das sogenannte TR (Thiazolrot, 59), in zahlreichen Studien von Wagenknecht *et al.* sowie Okamoto *et. al* verwendet und zeigte in ihren Untersuchungen ähnliche Nützlichkeit wie bereits TO. Im Unterschied zu den bereits publizierten Chromophoren wurde stets die Carboxymethylen-Verknüpfung gewählt, welche

sich in vorhergehenden Untersuchungen als optimale Anbindung für Chromophore an FIT-DNA und FIT-PNA herausstellte.^[186, 197, 211]

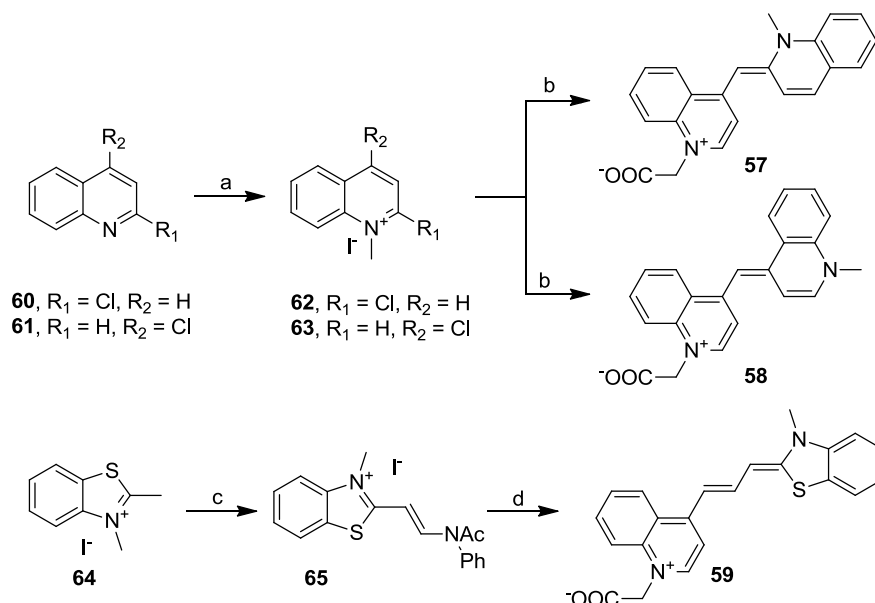


Abbildung 4.6.2: Synthese der Farbstoffe CV (**57**), CB (**58**) und TR (**59**). a) MeI, Reflux, 60% (**62**) 83% (**63**); b) carboxymyliertes Lepidin (**7**), NEt₃, CH₂Cl₂, 26% (**57**), 77% (**58**); c) *N,N*-Diphenylformamidin, Ac₂O, 150 °C, 78%; d) carboxymyliertes Lepidin (**7**), NEt₃, CH₂Cl₂, 84%.

In leichter Abänderung der von Lartia *et al.* publizierten Prozedur^[238] erfolgte die Darstellung der „Bischinolin-Farbstoffe“ durch die nukleophile Substitution von carboxymyliertem Lepidin (**7**) am chlorierten, elektronenarmen *N*-Methylchinolinium-Vorläufer **60** bzw. **61** und lieferte CV (**57**) und CB (**58**) in Ausbeuten von 26% bzw. 77%. Die geringe Ausbeute der CV-Synthese erklärt sich durch die gegenüber CB vergleichsweise schlechte Löslichkeit, wodurch die Reinigung erschwert wurde und das Produkt nicht vollständig isoliert werden konnte. Die Synthese von TR (**59**) erfolgte analog zur Prozedur von Ikeda *et al.* durch den Aufbau des Hemicyanins **65**,^[182] welches mit carboxymyliertem Lepidin zu TR (**59**) umgesetzt wurde.

4.6.2 Post-DNA-synthetische Farbstoffmarkierung

Zur Untersuchung der Chromophore wurde eine neue Strategie zu deren Einbau in DNA-FIT-Sonden erarbeitet. Dabei sollte die Aminogruppe des Serinolrückgrats orthogonal als Trifluoracetamid geschützt werden (Abb. 4.6.3A). Die Behandlung mit Ammoniak nach der DNA-Synthese würde somit das Amin freisetzen, an welches unterschiedliche Farbstoff-carboxylate gekuppelt werden können. Somit wurde es möglich, ein einzelnes Vorläufer-oligonukleotid für die Überprüfung mehrerer Farbstoffe zu nutzen, wodurch der Arbeits- und Materialaufwand verringert würden. Gleichzeitig könnte die Synthese der Serinol-Farbstoff-Phosphoramidite vermieden werden, sodass für andere Anwender ein einfacherer Zugang zu DNA-FIT-Sonden gelänge. Als Modellsequenz kam die vormals verwendete 27 Nt-lange *Neuraminidase*-Sequenz zum Einsatz (Abb. 4.6.3B). Analog zu den 15 Positionen, welche bereits für TO und JO sowie teilweise für BO (10 Positionen) untersucht wurden, sollte das TFA-

geschützte Serinol auf denselben 15 Positionen eingebaut werden und anschließend die Farbstoffmarkierung in einem kleinen Maßstab (jeweils ca. 20 nmol) erfolgen.

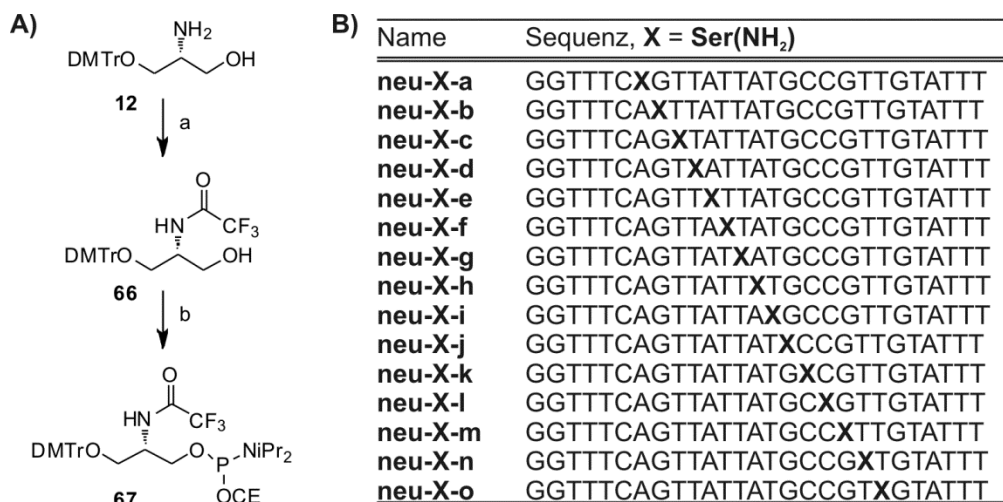


Abbildung 4.6.3: A) Synthese des Ser(TFA)-Phosphoramidits: a) Trifluoressigsäureethylester, NEt₃, CH₂Cl₂, 76%; b) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, EtNiPr₂, CH₂Cl₂, 73%; B) Sequenzübersicht der 15 Positionen zur Ser(NH₂)-Modifizierung innerhalb der Neuraminidase-Sequenz.

Die Darstellung Ser(NH₂)-markierter Oligonukleotide erfolgte ausgehend von Verbindung **12** durch die Blockierung der Aminogruppe mittels Trifluoressigsäureethylester (**66**), gefolgt von der Darstellung des Phosphoramidits **67**, welches nach flashchromatographischer Reinigung eine große Lagerstabilität zeigte. Nach der DNA-Synthese konnten aufgrund der Abwesenheit basenlabiler Farbstoffe die konventionellen Abspaltbedingungen (33% NH₃ aq. für 4 h bei 55 °C) verwendet werden, wobei ebenfalls das Trifluoracetamid gespalten wurde. Die Oligonukleotide wurden nach der DMTr-on-Strategie gereinigt und zeigten ausgezeichnete Ausbeuten an Vollängenprodukt (> 80%, siehe Abb. 4.6.4B). Nach Abspaltung der DMTr-Gruppe wurden die Oligonukleotide in Anwesenheit von NaCl gefällt. Ammoniumacetat wurde vermieden, um in der anschließenden Kupplung der Farbstoffe keine Acetylierung durch Aktivesterbildung von überschüssigem Acetat zu riskieren.

Die Kupplung von Chromophoren auf aminofunktionalisierte Oligonukleotide ist vielfach in der Literatur beschrieben und wird routinemäßig z.B. zur Darstellung von *Molecular Beacons* und *smFISH*-Sonden durchgeführt.^[132, 239] Für die Kupplung auf die interne, von den umgebenden Nukleobasen abgeschirmte Aminofunktion des Serinols war eine verringerte Markierungseffizienz zu erwarten. Versuche zur Kupplung mittels PyBOP, analog zur Synthese der markierten Serinolmonomere sowie einem Überschuss an Farbstoff erbrachten nur geringen Umsatz. Ein deutlich verbesserter Umsatz wurde durch die geringfügige Modifizierung eines Kupplungsprotokolls, welches zur Synthese von *ECHO*-Sonden von Okamoto *et al.* entwickelt wurde,^[240] erzielt.

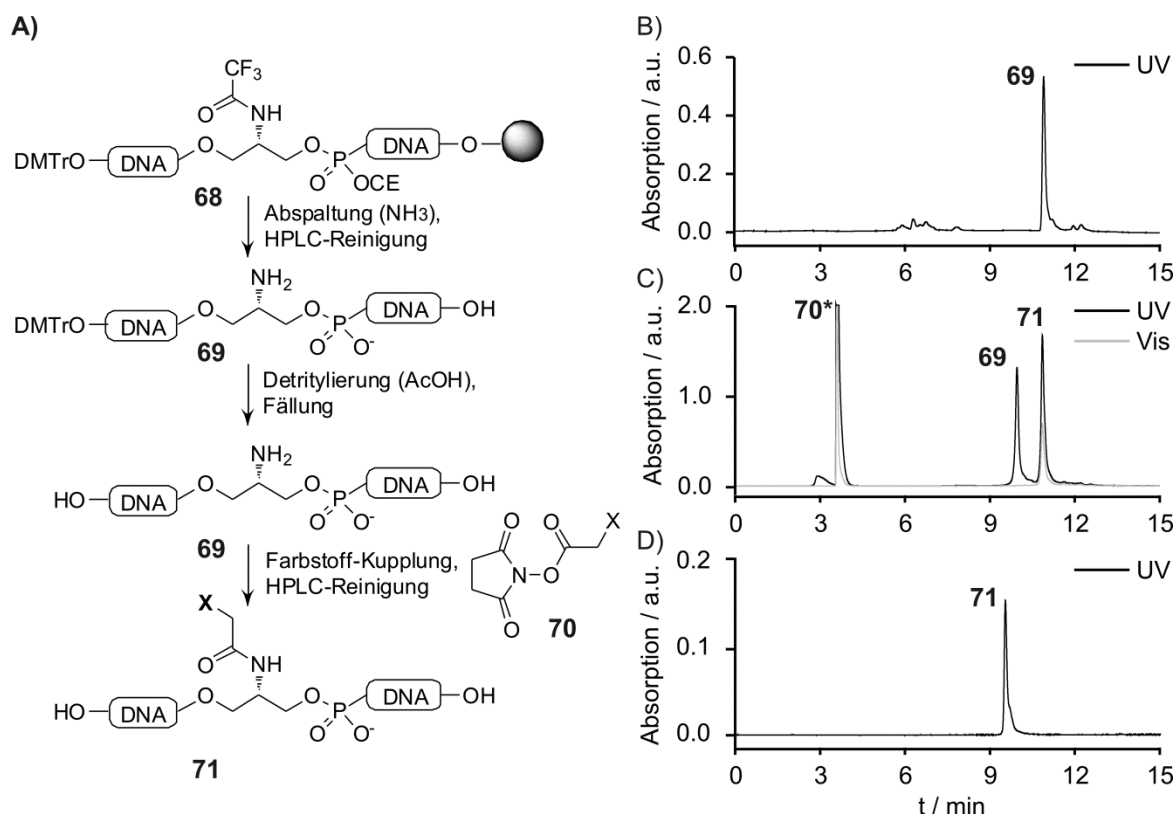


Abbildung 4.6.4: A) Schema der Abspaltung, Reinigung und nachträglichen Kupplung der Farbstoffe zur Darstellung von DNA-FIT-Sonden. B-D) Exemplarische HPLC-RP-UV/Vis-Chromatogramme eines Rohprodukts **69** (B), der Reinigung nach Kupplung der Farbstoffe-NHS-Ester (C) und zur Analyse der Reinheit der finalen Sonden (D); für **70*** ist der hydrolysierte Aktivester anzunehmen.

Der jeweilige Farbstoff wurde in DMF suspendiert, mit PPTS versetzt und mittels Diisopropylcarbodiimid (DIC) und *N*-Hydrosuccinimid (NHS) zum Farbstoff-NHS-Ester (**70**) umgesetzt. Die **Ser(NH₂)**-Oligonukleotide wurden in NaHCO₃-Lösung (0.1 M) vorgelegt, mit der NHS-Ester-Lösung (100 Äq. Farbstoff) versetzt und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Verwendung einer 1:1 Mischung aus wässriger Phase und DMF erwies sich hierbei als ideal. Ein zu großer Anteil an DMF führte zur Ausfällung der Oligonukleotide, während eine zu große Menge an Wasser zum Ausfällen des Farbstoffs führte. Durch das Fällern der Oligonukleotide mittels *i*PrOH konnte ein Großteil der Reagenzien entfernt werden. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, per Spritzenfilter von unlöslichen Bestandteilen getrennt und mittels Umkehrphasenchromatographie gereinigt. Dabei konnte das Produkt (**71**) von verbleibendem Farbstoff (**70***) sowie nicht-umgesetztem Oligonukleotid (**69**) getrennt werden (Abb. 4.6.4C) und wurde mit einer ausgezeichneten Reinheit in 30-60%-iger Ausbeute erhalten (Abb. 4.6.4D). Nach diesem Protokoll wurden alle CV-, CB- und TR-markierten Sonden hergestellt. Die BO- bzw. TO-markierten Sonden wurden (wie in Kapitel 4.1 beschrieben) unter Verwendung der bekannten **Ser(BO)**- bzw. **Ser(TO)**-Phosphoramidite hergestellt bzw. waren aus den vorherigen Untersuchungen vorhanden.

4.6.3 Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe in FIT-DNA

Die Fluoreszenzeigenschaften der Sonden wurden vor und nach der Hybridisierung mit vollständig komplementärer RNA untersucht (siehe Tabelle 4.6.1). Die Zuverlässigkeit von

Ser(TO) wurde bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert und mehrfach belegt. Elf der 15 Sonden zeigten eine Responsivität von $I/I_0 \geq 4$ und immerhin vier Sonden zeigten $I/I_0 \geq 10$. Im Gegensatz dazu wurde für BO deutlich verringerte Responsivität festgestellt. Der maximale Anstieg beträgt $I/I_0 = 5.6$, sechs Sonden zeigen immerhin $I/I_0 \geq 3$, während die übrigen quasi nicht-responsiv waren.

Tabelle 4.6.1: Vergleich der verschiedenen Farbstoffe innerhalb der 27mer-Neuraminidase Sequenz.

neu -X ^a	X = Ser(BO)			X = Ser(TO)			X = Ser(CV)			X = Ser(CB)			X = Ser(TR)		
	I_0	I	I/I_0	I_0	I	I/I_0	I_0	I	I/I_0	I_0	I	I/I_0	I_0	I	I/I_0
a	18	39	2	4.3	29	7	0.5	9	18	0.7	20	28	94	86	0.9
b	19	66	3	8.6	48	6	1.1	11	10	1.1	28	25	101	98	1.0
c	32	89	3	5.6	68	12	0.9	11	12	1.6	24	15	105	74	0.7
d	20	22	1	4.9	18	4	0.5	4	7	0.9	27	30	98	82	0.8
e	15	46	3	6.2	66	11	0.5	20	40	0.9	58	64	92	111	1.2
f	36	41	1	3.8	19	5	0.9	4	5	1.1	24	23	114	91	0.8
g	37	20	1	9.7	16	2	1.0	4	4	1.4	19	14	125	86	0.7
h	21	31	2	8.6	54	6	1.0	20	21	0.9	38	42	117	128	1.1
i	33	18	1	7.6	11	1	1.3	2	1	1.4	9	6	102	72	0.7
j	32	45	1	13.5	42	3	1.6	18	11	3.0	30	10	110	99	0.9
k	17	99	6	8.7	42	5	1.3	10	8	1.6	21	14	98	56	0.6
l	23	79	4	3.5	23	7	0.4	4	11	0.7	29	44	83	54	0.7
m	36	50	1	4.2	41	10	0.4	20	50	0.5	74	152	81	142	1.8
n	17	66	4	4.4	52	12	0.5	7	15	0.8	25	32	88	73	0.8
o	25	22	1	3.5	11	3	0.5	2	5	1.2	43	35	117	79	0.7

[a] Vollständige Sequenzen sind in Abb. 4.6.3 gezeigt. Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 2.5 μ M neu-RNA bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7); BO: $\lambda(\text{ex}) = 440$ nm, $\lambda(\text{em}) = 485$ nm; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 535$ nm; CV: $\lambda(\text{ex}) = 530$ nm, $\lambda(\text{em}) = 570$ nm; CB: $\lambda(\text{ex}) = 560$ nm, $\lambda(\text{em}) = 605$ nm; TR: $\lambda(\text{ex}) = 610$ nm, $\lambda(\text{em}) = 660$ nm; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Bei der Untersuchung der neuen Farbstoffe zeigte die beste CV-markierte Sonde einen 50-fachen Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung und somit eine mehr als vierfach vergrößerte Responsivität gegenüber der besten TO-Sonde ($I/I_0 = 12$). Ebenfalls ein Großteil der weiteren CV-Sonden zeigte ausgezeichnete Fluoreszenzanstiege, neun der 15 Sonden erfahren eine Intensivierung von $I/I_0 \geq 10$. Bei der Analyse der absoluten Fluoreszenzintensität wurde jedoch deutlich, dass die große Responsivität durch ein extrem geringes Signal im Einzelstrang verursacht wird, während die absolute Intensität im Doppelstrang gegenüber BO und TO sehr niedrig ausfiel ($I_{\text{max}}(\text{CV}) = 20$ a.u., $I_{\text{max}}(\text{TO}) = 68$ a.u.).

Die größte Leistungsfähigkeit zeigten die CB-markierten Sonden mit einer maximal 152-fachen Fluoreszenzintensivierung. Es ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine leistungsfähigere einfach-markierte Sonde berichtet wurde. Auch die übrigen CB-Sonden zeigten starke Fluoreszenzanstiege. Zwei Drittel der Sonden zeigten $I/I_0 \geq 20$, während 14 der 15 Sonden eine Responsivität von $I/I_0 \geq 10$ aufwiesen. Auch für CB beruht die starke Responsivität auf einem extrem geringen Signal im Einzelstrang. Die absolute Intensität der hybridisierten CB-Sonden ist jedoch vergleichbar mit jener TO-markierter Sonden.

Im Gegensatz dazu zeigten die TR-modifizierten Sonden keinen Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung. Auf elf Positionen wurde eine verminderte Fluoreszenz bei Hybridisierung

beobachtet, sodass dieses Chromophor kaum Responsivität in FIT-Sonden aufwies. Interessanterweise ist sowohl im Einzel- als auch im Doppelstrang das Fluoreszenzsignal des TR deutlich größer als jenes aller übrigen Farbstoffe. Eine Erklärung könnte das Konzept des *Cyanine-Limits* bieten, welches besagt, dass die Verlängerung von Polymethinketten in der Angleichung der Bindungsordnung zwischen den Einfach- und Doppelbindungen resultiert. Dadurch würde die intramolekulare Rotation gehemmt, weswegen eine vergrößerte Quantenausbeute für Farbstoffe mit längeren Polymethingerüsten beobachtet wird.^[241]

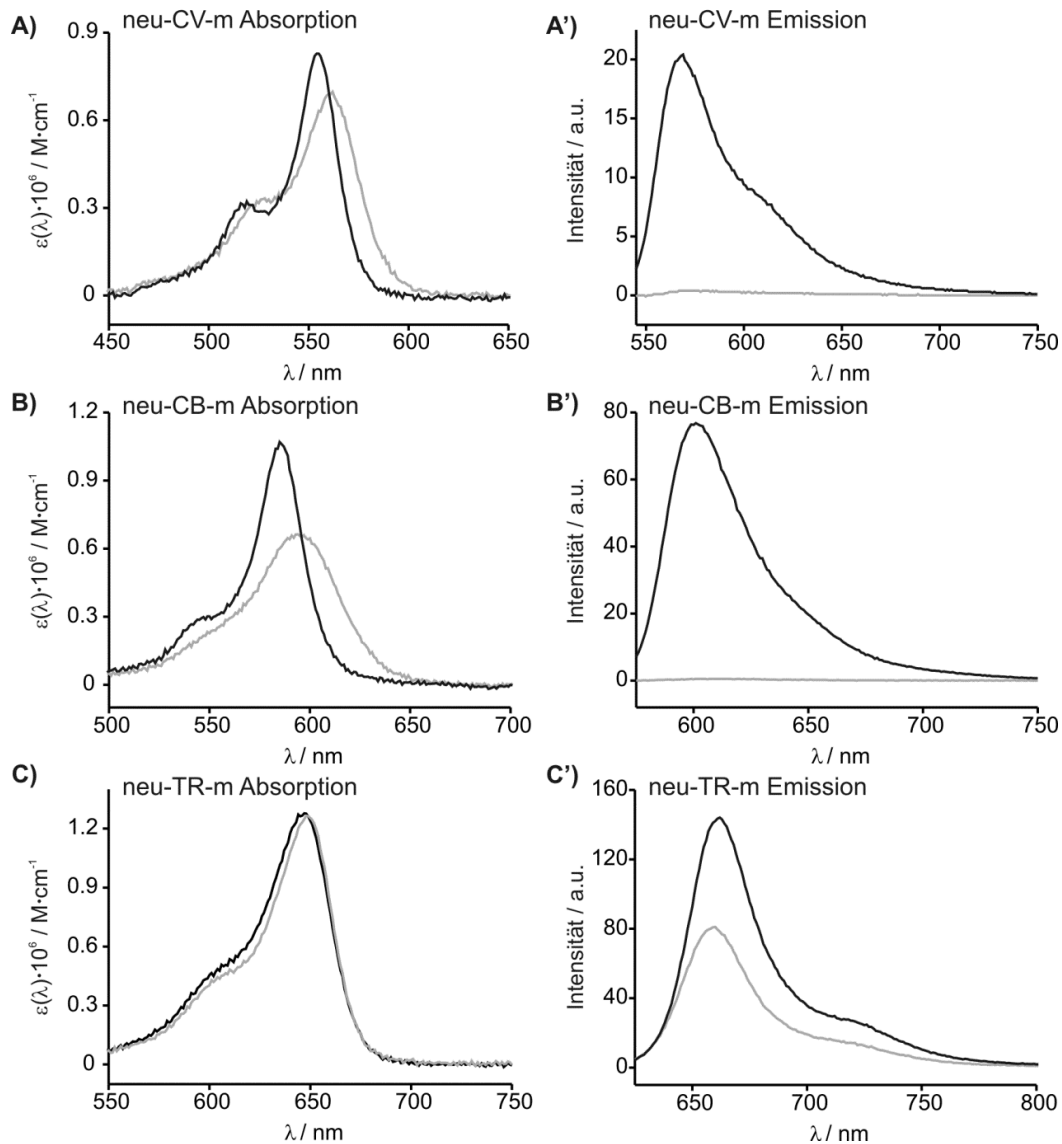


Abbildung 4.6.5: Exemplarische Absorptions- und Emissionsspektren der Chromophore CV (A+A'), CB (B+B') sowie TR (C+C') im Einzelstrang (grau) und im Doppelstrang mit 2.5 Äq. komplementärer RNA (schwarz). Bedingungen: 0.5 μM Sonde (Sequenz: **neu-Farbstoff-m**) und 2.5 μM **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7); CV: $\lambda(\text{ex}) = 530 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 545\text{-}750 \text{ nm}$; CB: $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}750 \text{ nm}$; TR: $\lambda(\text{ex}) = 610 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 625\text{-}800 \text{ nm}$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Während die Form und das Maximum der Emissionskurven der neuen Chromophore nahezu unverändert blieben (Abb. 4.6.5 A', B', C'), wurde die Absorption von CV bzw. CB durch die Hybridisierung deutlich verändert. Für beide Farbstoffe wurde eine bathochrome Verschiebung (7 nm für CV (Abb. 4.5.6A) bzw. 9 nm für CB (Abb. 4.5.6B)) festgestellt. Das

Absorptionsspektrum wurde schmaler und die maximale Extinktion stieg an. Gleichzeitig wurde die Schulter der Absorptionskurven bei 519 nm (für CV) bzw. 545 nm (für CB) stärker betont. Diese Veränderungen deuten auf eine verstärkte Wechselwirkung von Chromophor und benachbarten Nukleobasen im Grundzustand hin. Zusammen mit den großen Fluoreszenzanstiegen für die Farbstoffe erscheint es plausibel, dass die Hybridisierung die Farbstoffe zu stärkeren Stapelwechselwirkungen zwingt. Für TR wurde hingegen lediglich eine bathochrome Verschiebung von 1-2 nm beobachtet, die Kurvenform blieb jedoch unverändert. Die Absorptions- und Emissionsspektren aller CV-, CB- und TR-markierten Sonden befinden sich im Anhang (Abb. 9.5.1-9.5.3). Aufgrund der großen Responsivität wurden die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der CB-markierten Sonden genauer untersucht (Tabelle. 4.6.2). Die zuvor diskutierte Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge und der absolute Wert korrelieren nicht mit der Responsivität. Jedoch kann beobachtet werden, dass alle hoch responsiven Sonden einen deutlich vergrößerten maximalen Extinktionskoeffizienten im Doppelstrang aufwiesen (z.B. **neu-CB-e**, **-l** und **-m**). Die Quantenausbeuten (mit Ausnahme von **neu-CB-j**) fallen mit Werten von 0.01 im Einzelstrang sehr gering aus. Im Doppelstrang werden Werte von 0.04-0.24 erhalten, sodass diese ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den für TO beobachteten Werten liegen (vgl. Kapitel 4.3.3). Aufgrund der Zunahme des Extinktionskoeffizienten bei Hybridisierung ist die Zunahme der Quantenausbeute etwas geringer als die Fluoreszenzintensivierung (I/I_0).

Tabelle 4.6.2: Vergleich der Absorptions- und Emissionseigenschaften der CB-markierten Sonden.

neu-	Einzelstrang				Doppelstrang				I/I_0	Φ/Φ_0	$\Delta\lambda$ / nm
	I_0	ε_0^a	λ_0^b	Φ_0^c	I	ε^a	λ^b	Φ^c			
CB-a	0.7	62	592	0.004	20	58	591	0.13	28	29	1
CB-b	1.1	79	591	0.006	28	84	588	0.11	25	20	3
CB-c	1.6	70	593	0.008	24	92	586	0.09	15	11	7
CB-d	0.9	51	592	0.006	27	76	588	0.13	30	22	4
CB-e	0.9	75	590	0.005	58	100	586	0.21	64	43	4
CB-f	1.1	77	596	0.005	24	90	586	0.08	23	18	10
CB-g	1.4	62	589	0.007	19	64	589	0.11	14	15	0
CB-h	0.9	55	592	0.007	38	69	587	0.20	42	31	5
CB-i	1.4	63	590	0.008	9	68	592	0.04	6	6	2
CB-j	3.0	62	591	0.017	30	69	591	0.14	10	9	0
CB-k	1.6	87	591	0.007	21	100	591	0.08	14	12	0
CB-l	0.7	76	595	0.004	29	102	588	0.12	44	32	7
CB-m	0.5	66	594	0.002	74	107	585	0.24	152	102	9
CB-n	0.8	70	593	0.004	25	90	589	0.09	32	23	4
CB-o	1.2	77	590	0.006	43	100	590	0.16	35	26	0

[a] Extinktionskoeffizient im Maximum des Vis-Bereichs (in $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), [b] Wellenlänge der maximalen Absorption (in nm), [c] Quantenausbeute, bestimmt unter Verwendung von Atto590 als Standard.

4.6.4 Vergleich von TO- und CB-markierten 1-Nt-Abstand Sonden

Wie es bereits in Kapitel 4.2 für TO diskutiert wurde, so gilt ebenfalls für CB, dass eine ideale Sonde nicht nur eine große Responsivität sondern gleichzeitig eine große Quantenausbeute

bzw. Helligkeit besitzt. Eine große Helligkeit ist besonders bei starker zellulärer Hintergrundfluoreszenz sowie zur Detektion geringer RNA-Mengen notwendig. Auch für CB war zu erwarten, dass ein benachbartes LNA-Nukleotid die Sondenhelligkeit deutlich steigert. Im Folgenden sollte ein Vergleich von TO- sowie CB-markierten, LNA/2'-O-Me-modifizierten 1-Nt-Abstand-Sonden gezogen werden, um die Eignung der CB-Sonden für die Lebendzell-Bildgebung zu beurteilen. Ein gut untersuchtes Beispiel für besonders starke zelluläre Autofluoreszenz stellen Zebrafischembryonen (*Danio rerio*) dar. Als Zielsequenz wurde die *Vasa*-mRNA ausgesucht, welche analog zu *Oskar* in *Drosophila melanogaster* eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung spielt. Im Folgenden wurden fünf Segmente von *Vasa*-mRNA auf jeweils vier Positionen mit **Ser(TO)** markiert (siehe Tabelle 4.6.2). Die jeweils beste Position wurden anschließend in **Ser(TO)**- sowie **Ser(CB)**-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden überführt.

Tabelle 4.6.3: Fluoreszenzeigenschaften der **Ser(TO)**-markierten Sonden zur Detektion von *Vasa*-RNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	I_0	I	I/I_0	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br ^a
vasa1-1	TCTAT X TTTCATCATTTTCA	16	107	6.5	0.03	0.26	7.7	8.7
vasa1-2	TCTATT X TCATCATTTTCA	9	106	11.5	0.02	0.22	11.2	8.3
vasa1-3	TCTATTTTC X TCATTTTCA	8	109	13.9	0.02	0.26	15.3	8.8
vasa1-4	TCTATTTTTCATCAT X TTCA	12	86	7.2	0.03	0.21	8.2	7.2
vasa1RNA	412UGAAAAUGAUGAAAAUAGA ₄₃₀							
vasa2-1	TCCAT X TTTCATTATTTTCT	19	131	6.9	0.04	0.26	6.9	10.8
vasa2-2	TCCATTTTTC X TTATTTTCT	3	96	27.9	0.01	0.26	30.5	8.4
vasa2-3	TCCATTTTTCATT X TTTCT	5	103	22.7	0.01	0.27	25.5	9.1
vasa2-4	TCCATTTTTCATTAT X TTCT	5	93	17.6	0.01	0.22	17.7	7.8
vasa2RNA	553AGAAAAUAAUGAAAAUGGA ₅₇₁							
vasa3-1	TCTTG X TCCTCACTTGTC	25	218	8.7	0.06	0.43	7.6	17.3
vasa3-2	TCTTGATCC X ACTTGTC	24	52	2.1	0.06	0.11	1.9	4.2
vasa3-3	TCTTGATCCAA X TTGTC	40	69	1.7	0.08	0.18	2.3	7.3
vasa3-4	TCTTGATCCAACT X TGTC	16	97	6.1	0.03	0.18	5.5	8.0
vasa3RNA	725GACAAGUUGGAUCAAGA ₇₄₁							
vasa4-1	GGCC X CCGTTTTTCCTG	10	77	8.0	0.02	0.18	8.4	6.8
vasa4-2	GGCCGCC X TTTTTCCTG	16	82	5.2	0.03	0.18	5.8	6.7
vasa4-3	GGCCGCCCG X TTTTTCCTG	23	158	6.8	0.05	0.33	6.9	14.0
vasa4-4	GGCCGCCCGTT X TCCTG	14	126	8.7	0.03	0.24	7.8	10.1
vasa4RNA	1044CAGGAAAAACGGCGGCC ₁₀₆₀							
vasa5-1	GGAAXTACTTGTTGGGC	34	85	2.5	0.07	0.17	2.5	7.9
vasa5-2	GGAAC T ACTTGTTGGGC	12	96	8.1	0.02	0.18	7.3	7.9
vasa5-3	GGAAC T ACTT X TTGGGC	25	89	3.6	0.05	0.20	3.9	7.8
vasa5-4	GGAAC T ACTTG T XGGGC	66	27	0.4	0.12	0.06	0.5	2.5
vasa5RNA	2024GCCCAACAAGUAGUUC ₂₀₄₀							

Bedingungen: 0.5 μ M Sonden und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7) bei 37 °C; $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700$ nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, Atto520 wurde als Standard zur Bestimmung der Quantenausbeute verwendet; [a] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Sonden zur weiteren Untersuchung wurden grau markiert; tiefgestellte Zahlen geben die Position der RNA-Segmente auf der vollständigen *Vasa*-mRNA an.

Die Sonden wurden anhand ihrer Fluoreszenzintensivierung, sowie der Quantenausbeute und Helligkeit charakterisiert. So wurden erstmals DNA-FIT-Sonden mit einer Responsivität $I/I_0 > 20$ (**vasa2-2** und **vasa2-3**) erhalten. Erneut wird deutlich, dass nicht allein die unmittelbar

benachbarten Nukleotide die Fluoreszenzeigenschaften bestimmen, sodass auch hier der häufig verwandte Sequenzkontext „T-X-T“ eine breite Streuung der Responsivität aufweist ($I/I_0 = 3.6-22.7$). Für jedes Segment wurde eine vielversprechende Sonde ausgewählt, welche anschließend als Vorlage für TO- und CB-markierte 2'-O-Me/LNA-Mixmere diente (siehe Tabelle 4.6.4). Wie bereits bei den TO-markierten Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA wurde darauf geachtet, dass die Vorläufersonden keine besonders große Quantenausbeute besitzen, sodass LNA überhaupt noch einen positiven Einfluss auf die Quantenausbeute im Doppelstrang ausüben kann. Andernfalls würde lediglich der Einzelstrang verstärkte Emission zeigen. Aus diesem Grund wurde beispielsweise **vasa3-4** und nicht **vasa3-1** als Vorläufersonde ausgewählt.

Um einen alternativen Zugang zu CB-markierten Sonden zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Untersuchung ein **Ser(CB)**-Phosphoramidit dargestellt. Die Synthese verlief analog zu anderen Farbstoffderivaten (siehe Kapitel 4.1 und 4.2) in guten Ausbeuten durch die PyBOP-vermittelte Kupplung des carboxymethylierten CB auf das Serinolrückgrat, gefolgt von der Abspaltung der TBS-Gruppe sowie der Phosphitylierung (siehe Abb. 4.6.8).

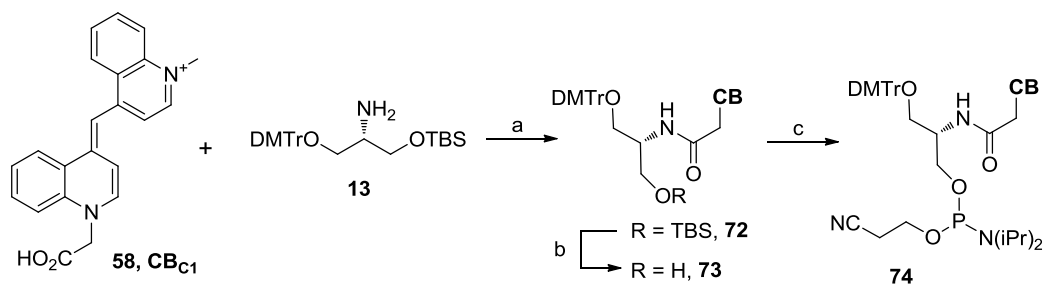


Abbildung 4.6.6: Synthese des **Ser(CB)**-Phosphoramidits. a) PyBOP, NMM, PPTS, DMF, 72%; b) TBAF·3H₂O, THF, 54%; c) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Et₃NiPr₂, CH₂Cl₂, 70-90%.





















Die DNA-Synthese verlief nach derselben Prozedur wie für TO-markierte Sonden. Es waren keinerlei Modifikationen notwendig, sodass die folgenden TO- bzw. CB-Mixmere nach der etablierten Methode hergestellt und gereinigt wurden.

Die TO-markierten 1-Nt-Abstand-Sonden zeigten wie erwartet eine deutlich gesteigerte Quantenausbeute im Vergleich zu den DNA-Sonden (Tabelle 4.6.4). Abgesehen von **vasa-TO-3**, welches geringe Responsivität durch die bereits im Einzelstrang hohe Quantenausbeute besitzt, wurden für alle TO-markierten Sonden ausgezeichnete Fluoreszenzeigenschaften erzielt. Die Helligkeiten waren vergleichbar mit denen bisheriger LNA-modifizierter Sonden, während die Fluoreszenzanstiege deutlich oberhalb der bisher erzielten Leistungsfähigkeit lagen ($\Phi/\Phi_0 = 10-46$).

Die CB-markierten 1-Nt-Abstand Sonden zeigten trotz der modifizierten Nukleotide extrem geringe Einzelstrangfluoreszenz bzw. Quantenausbeuten. Die maximale Fluoreszenzintensivierung lag mit $I/I_0 = 195$ (bzw. $\Phi/\Phi_0 = 113$) deutlich über den vormals diskutierten *Neuraminidase*-Sonden. Durch die großen Quantenausbeuten (0.45-0.47) wurde zusätzlich eine 24-31% gesteigerte Helligkeit gegenüber den sequenzanalogen TO-Sonden erhalten. Trotz der erzielten Bestwerte für TO-Mixmere, stellte sich CB als in jeder Hinsicht (Helligkeit, Quantenausbeute, Zuverlässigkeit) überlegener Reporter heraus. Die Nützlichkeit dieser TO-

und CB-markierten Sonden soll zukünftig ebenfalls in der Lebenszell-Bildgebung verglichen werden.

Tabelle 4.6.4: Ser(TO)- und Ser(CB)-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden zur Detektion von *Vasa*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO), Y = Ser(CB)	I_0	I	I/I_0	Φ_0	$\Phi^{[a]}$	Φ/Φ_0	$Br^{[b]}$
vasa-TO-1	<u>TCTATTTTC</u> X <u>T_LCATTTTCA</u>	6	202	 33	0.01	0.33	 31	15.1
vasa-TO-2	<u>TCCATTTTC</u> X <u>T_LTATTTTCT</u>	3	173	 51	0.01	0.29	 46	13.4
vasa-TO-3	<u>TCTTGATCCAAC</u> X <u>T_LGTC</u>	51	180	 4	0.08	0.27	 3	13.4
vasa-TO-4	<u>GGCCGCCGTT</u> X <u>T_LTCCTG</u>	11	224	 20	0.03	0.32	 12	15.7
vasa-TO-5	<u>GGAACACTAC</u> X <u>T_LGTTGGGC</u>	15	180	 12	0.03	0.26	 10	13.4
vasa-CB-1	<u>TCTATTTTC</u> Y <u>T_LCATTTTCA</u>	1	154	 195	< 0.01	0.45	 113	19.1
vasa-CB-2	<u>TCCATTTTC</u> Y <u>T_LTATTTTCT</u>	2	151	 72	0.01	0.47	 54	19.1
vasa-CB-3	<u>TCTTGATCCAAC</u> Y <u>T_LGTC</u>	2	195	 87	0.01	0.48	 54	21.6
vasa-CB-4	<u>GGCCGCCGTT</u> Y <u>T_LTCCTG</u>	1	158	 125	0.01	0.47	 71	19.5
vasa-CB-5	<u>GGAACACTAC</u> Y <u>T_LGTTGGGC</u>	2	164	 69	0.01	0.45	 39	20.2

Bedingungen: 0.5 μ M Sonden und 5 Äq. komplementäre RNA bei Zugabe, in PBS bei 37 °C; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 530$ nm, CB: $\lambda(\text{ex}) = 560$ nm, $\lambda(\text{em}) = 610$ nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, Atto520 wurde als Standard zur Bestimmung der Quantenausbeute verwendet, Atto590 für CB; [a] Br = Helligkeit im gebundenen Zustand in $\text{mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.6.5 Simultane Detektion von vier verschiedenen RNA-Sequenzen

Um die Eignung von FIT-Sonden zur simultanen Detektion mehrerer RNAs zu überprüfen, wurden BO-, TO-, und CB-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden unterschiedlicher Sequenzen ausgewählt (Abb. 4.6.7). Der LNA-Effekt auf BO-Sonden wird in Kapitel 4.8. näher erläutert. Um die Spezifität der Sonden zu überprüfen, wurden die Sonden vorgelegt und zunächst mit den beiden jeweils nicht-komplementären RNAs (z.B. BO-Sonde + TO-Ziel-RNA und CB-Ziel-RNA) versetzt. Anschließend wurde komplementäre Ziel-RNA hinzugegeben (Abb. 4.6.7A-C). Bei Zugabe von nicht-komplementärer RNA wurde keine Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet (graue und gestrichelte Linien in Abb. 4.6.7A-C), während die Zugabe der jeweils komplementären RNA zu den erwarteten starken Fluoreszenzanstiegen führte (durchgehende Linien in Abb. 4.6.7A-C). Die Fluoreszenzintensivierung ließ sich ebenfalls mit bloßen Augen und Bestrahlung der Küvetten mit einer UV-Lampe (5 Watt) feststellen (Abb. 4.6.7A'-C'). Die große Sequenzspezifität der ausgewählten Sonden sollte ebenfalls die simultane Detektion der drei Ziel-RNAs in derselben Küvette erlauben. Dazu wurde PBS-Puffer vorgelegt und die Sonden sowie ihre Ziel-RNA nacheinander zugegeben.

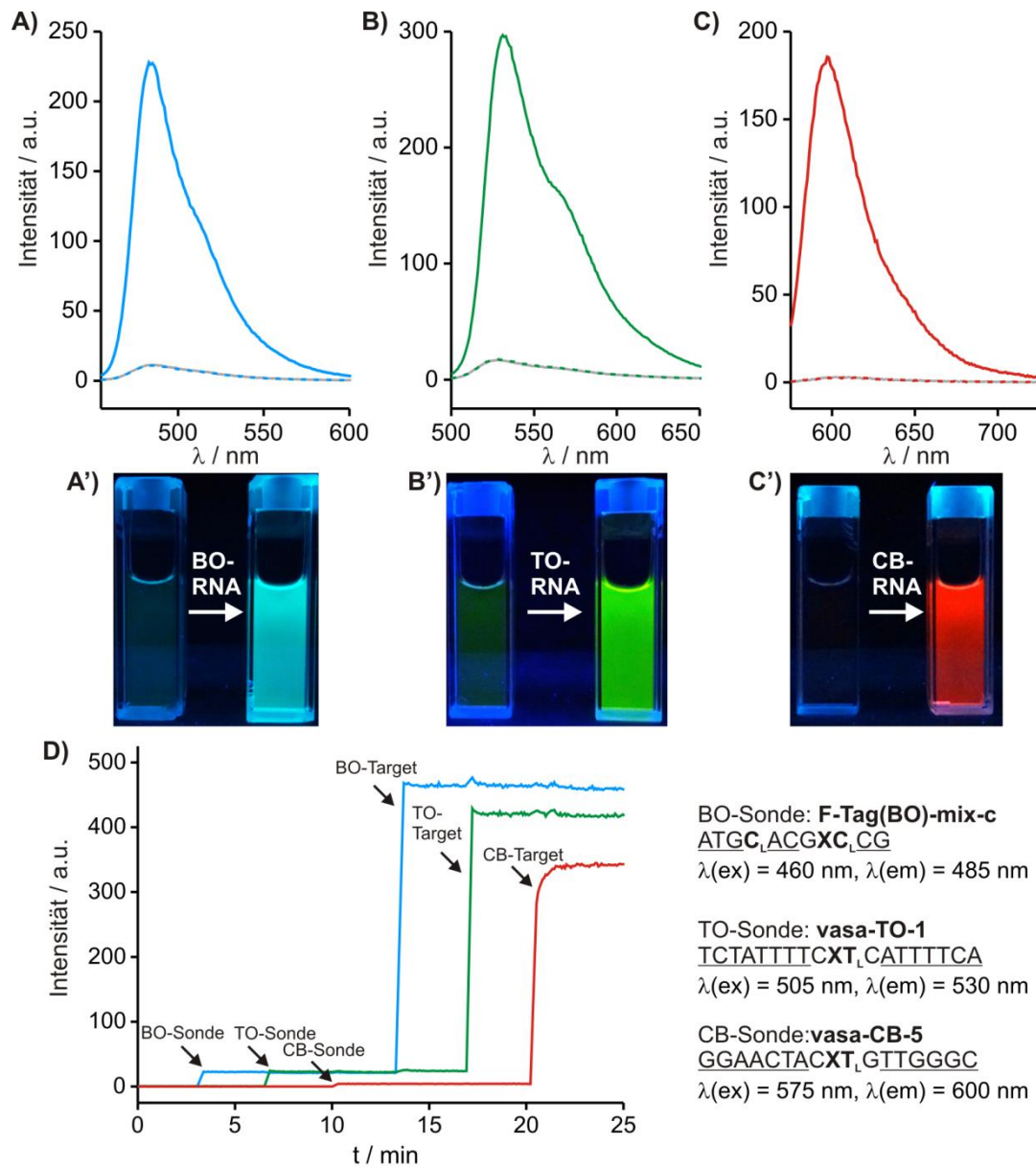


Abbildung 4.6.7: A-C) Untersuchung der Sequenzspezifität der BO-A), TO-B) und CB-Sonde (C); Fluoreszenzemission der jeweiligen Sonde im Einzelstrang (grau), nach Zugabe der beiden jeweils nicht-komplementären Ziel-RNAs (gestrichelt) sowie nach Zugabe von komplementärer RNA (durchgehende, farbige Linien). A'-C') Fotos der Fluoreszenzküvetten der Sonden (0.5 μM) im Einzelstrang und nach Zugabe von komplementärer RNA (3 \AA q.). D) Simultane Detektion von drei RNAs durch die konsekutive Zugabe von Sonden und Ziel-RNAs (mit Pfeilen markiert). Bedingungen: A-D) 0.5 μM Sonde, und 3 \AA q. der jeweiligen RNA, bei Zugabe, in PBS-Puffer, A-C) BO: $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}600 \text{ nm}$, TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}650 \text{ nm}$, CB: $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}725 \text{ nm}$, D) Anregung und Emission: siehe Abbildung. Alle Experimente: slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Die Detektion der einzelnen Farbkanäle erfolgte durch Auslesung des Emissionsmaximums unter Anregung 25 nm unterhalb der Emissionswellenlänge (Abb. 4.6.7). Die Zugabe der Sonden führt nur auf dem jeweiligen Farbkanal zu einem schwachen Fluoreszenzanstieg. Es konnte keine signifikante gegenseitige Beeinflussung festgestellt werden. Offensichtlich liegen die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verschiedenen Farbkanäle weit genug voneinander entfernt, um eine spektrale Überlappung zu vermeiden. Auch bei Zugabe der Ziel-RNAs wurde keine unspezifische Fluoreszenzantwort beobachtet. Auch bei der

simultanen Detektion von drei RNAs in derselben Küvette wurden starke, hochspezifische Fluoreszenzanstiege festgestellt. Durch das 1-Nt-Abstand-Sondendesign erschienen alle Fluoreszenzkanäle in vergleichbarer Fluoreszenzintensität. Diese Ergebnisse zeigen, dass in zukünftigen Experimenten die Kombination von BO-, TO- und CB-Sonden die simultane Detektion verschiedener RNAs in Zellen ermöglichen sollte.

4.6.6 Sequenzabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von DNA-FIT-Sonden

Für die responsivsten Chromophore dieser Untersuchung zeigte die Position „**neu-X-i**“ stets die mit Abstand geringste Fluoreszenzerhöhung, während andere Positionen (z.B. **neu-X-m** oder **neu-X-e**) stets besonders starke Fluoreszenzanstiege erbrachten. Daraus wird deutlich, dass die Fluoreszenzeigenschaften der Sonden maßgeblich durch die Wechselwirkungen mit benachbarten Nukleotiden bestimmt werden. Zusätzlich können zahlreiche weitere Faktoren wie z.B. die Gesamtlänge der Sonden, der GC-Gehalt, sowie die relative Positionierung des Chromophors bzw. dessen Abstand zum Ende des Oligonukleotids die Fluoreszenz des Reporters beeinträchtigen. Da je nach biologischer Fragestellung, die Sequenz und die Länge der Sonde sowie die Positionierung des Chromophors eingeschränkt sind, erschien es zwecklos alle Parameter zu optimieren und zu vergleichen. Sinnvoll erschien hingegen, die Sequenzumgebung auf ungünstige sowie günstige Positionierung des Chromophors hin zu untersuchen. Eine Vorstellung von geeigneten Sequenzkontexten würde das Design zukünftiger Sonden erleichtern und dabei die Anzahl der zu synthetisierenden Sonden weiter verringern bzw. umgekehrt könnte die Kenntnis über ungünstige Sequenzkontexte als Ausschlusskriterium dienen.

Die vormals gezeigten 15 Positionen der *Neuraminidase*-Sequenz sind bei weitem nicht ausreichend, um den Zusammenhang zwischen Sequenz und Fluoreszenz zu ergründen. Jedoch ließ sich eine Tendenz in der Umgebungsabhängigkeit des Fluoreszenzanstiegs erkennen. Die Analyse der Sonden erfolgte anhand der Nachbarbasen 3' und 5' des Farbstoffs und ihrer Unterteilung in Purin- und Pyrimidinbasen (Abb. 4.6.8). Der bereits erwähnte, niedrigste Fluoreszenzanstieg bei CV, TO und CB ist durch die Flankierung zweier Purine gekennzeichnet. Ebenfalls niedrige Responsivitäten für TO wurden durch 3'-Pyrimidin und 5'-Purin erhalten. Sequenzen mit 5'-Purin zeigten deutlich größere Fluoreszenzanstiege (Abb. 4.6.8A). Dies verdeutlichte, dass nicht nur die Nukleobasen selbst entscheidend sind, sondern ebenfalls, ob sie 3' oder 5' des Reporters positioniert sind. Für CB ergaben alle Sonden mit mindestens einem Pyrimidin in Nachbarschaft ausgezeichnete Responsivitäten, die Flankierung durch zwei Pyrimidine zeigte dabei die größte Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit (Abb. 4.6.8B).

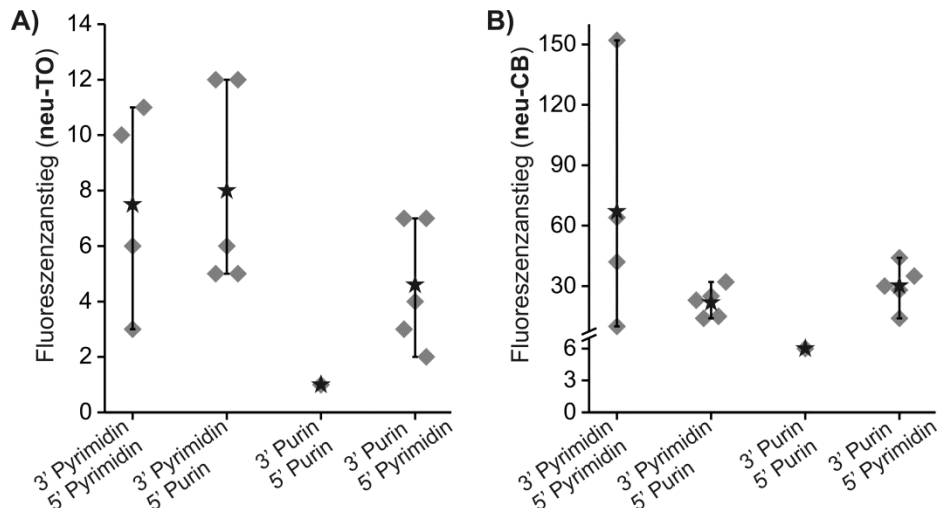


Abbildung 4.6.8: Sequenzanalyse der Fluoreszenzerhöhung bei 37 °C von A) TO- und B) CB-markierten Neuraminidase-Sonden; graue Punkte zeigen die absoluten Werte, schwarze Sterne zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Um ein genaueres Bild von der Sequenzabhängigkeit des TO in PNA-FIT-Sonden zu erhalten, wurde eine detaillierte Studie von Dr. Dilip Jarikote angefertigt. Dabei wurde innerhalb derselben Sequenz jeweils die Nukleobase 3', 5' oder gegenüber des **Aeg(TO)**-Monomers ausgetauscht und somit insgesamt 64 Sequenzkontexte bei Hybridisierung mit DNA untersucht.^[242] In der Arbeitsgruppe Seitz diente diese Studie als Vorlage zum Design neuer PNA-FIT-Sonden. Es stellte sich jedoch heraus, dass aufgrund zahlreicher, die Fluoreszenz beeinflussender Parameter, die idealen Sequenzkontexte des Modells nur selten leistungsfähige PNA-FIT-Sonden auf anderen Zielsequenzen erzeugten.

Für DNA-FIT-Sonden wäre eine ähnliche Studie denkbar, welche ebenfalls nur auf eine Modellsequenz beschränkt wäre und somit die Übertragbarkeit der Erkenntnisse fraglich wäre. Zusätzlich galt das Hauptinteresse der Detektion von RNA, sodass eine solche Studie, neben dem Synthesaufwand ebenfalls hohe finanzielle Anforderungen stellen würde. Stattdessen wurde alle bereits vorhandenen, mit RNA untersuchten, **Ser(TO)**-markierten Sonden (> 90) einer Sequenzanalyse unterzogen (Abb. 4.6.9). Dazu wurde stets der Fluoreszenzanstieg bei 37 °C unter den üblichen Messbedingungen (5 Äq. Ziel RNA, PBS-Puffer, pH 7) verwendet, LNA- und/oder 2'-O-Me-markierte Sonden wurden nicht berücksichtigt. Erneut wurde für die Flankierung durch Purine die geringsten Fluoreszenzerhöhungen gefunden ($I/I_0 = 1.4-4.6$) sowie die geringe Performance für 3'-Pyrimidine und 5'-Purin bestätigt ($I/I_0 = 1.0-6.7$). Die Flankierung durch Pyrimidine zeigte eine breite Streuung ($I/I_0 = 2.4-27.9$) mit einem Mittelwert von $I/I_0 \approx 8$. Für 3'-Purin und 5'-Pyrimidin wurde ebenfalls eine breite Verteilung ($I/I_0 = 1.1-20.8$) des Fluoreszenzanstiegs, jedoch ein vergleichbarer Mittelwert erhalten. Die breite Verteilung und vor allem die niedrigen Minima auch bei bevorzugten, 3'-Pyrimidin-tragenden Sequenzen verdeutlichen erneut die Schwierigkeit eine Universallösung zum Sondendesign zu finden, jedoch sollte als Ausschlusskriterium von der Verwendung eines 5'-Purins neben **Ser(TO)** abgesehen werden. Die etwas detaillierte Analyse der benachbarten Nukleobasen zeigt darüber hinaus, dass die Kombination von 3'-Thymin oder -Cytosin mit 5'-Cytosin oder -Guanin in zahlreichen

Sondensequenzen stets eine Responsivität von $I/I_0 \geq 4$ erhalten wurde, sodass solche Sequenzabschnitte bevorzugt für neue Sonden verwendet werden sollten.

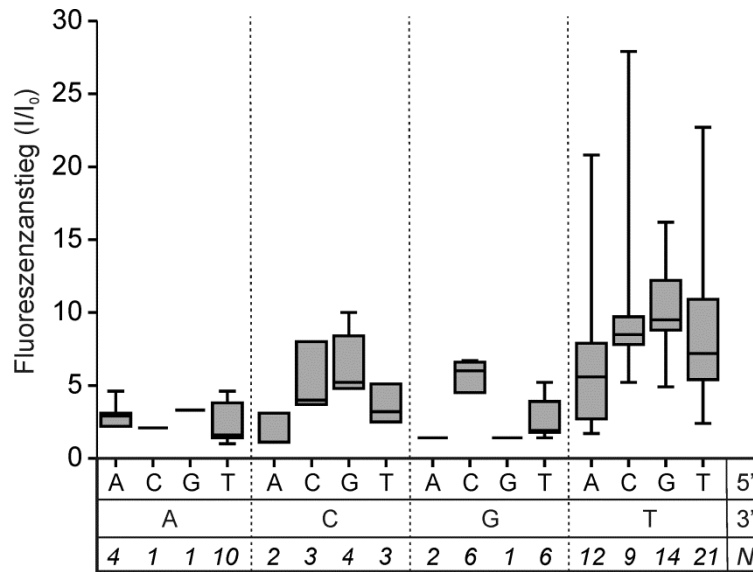


Abbildung 4.6.9: Analyse des Fluoreszenzanstiegs aller bisher dargestellten TO-markierten DNA-FIT-Sonden bei Hybridisierung mit komplementärer RNA bei 37 °C. Modifizierte Sonden mit 2'-O-Me oder LNA wurden nicht eingeschlossen.

Diese Analyse schließt zwar zahlreiche Sequenzkontexte, unterschiedliche Sondenlängen, Schmelztemperaturen etc. ein, ist jedoch durch Fluoreszenzergebnisse, welche im Laufe der Arbeit erhalten wurden, beeinflusst. So wurden z.B. 3'-Thymin-tragenden Sonden, aufgrund der auffällig guten Fluoreszenzeigenschaften häufiger zum Design neuer Sonden verwendet, was ebenfalls den vergrößerten Umfang der Stichprobe (N in Abb. 4.6.9) erklärt. Eine weitere Beobachtung, welche jedoch aufgrund der Komplexität keine statistische Auswertung zuließ, ist die Abhängigkeit der Fluoreszenz von einem größeren Sequenzkontext als lediglich den nächsten Nachbarn. Weitert man die Analyse auf die beiden nächsten Nukleotide aus, so ergeben sich 256 mögliche Kombinationen, die es zu untersuchen gilt. Ohne eine automatisierte parallele Synthese und Aufreinigung ist solch ein Sondenumfang nur unter großem Aufwand zugänglich. Dennoch belegen erste Ergebnisse, dass mit Hilfe dieser Betrachtung in guter Reproduzierbarkeit leistungsstarke Sonden erhalten werden. Es wurde eine Analyse unter Farbkodierung der verschiedenen Nukleobasen angefertigt, welche einen Überblick über die größere Sequenzumgebung liefert. Diese wurde als Vorlage für die Auswahl der TO-Positionierung auf neuen Sondensegmenten verwendet. Dazu wurde die Sequenz der Ziel-RNA spezifisch nach solchen Segmenten durchsucht, welche die bisher beste Sequenzumgebung für **Ser(TO)** zulassen. Die Beispiele in Tabelle 4.6.6 zeigen die Reproduzierbarkeit von guten sowie schlechten Sequenzkontexten. Die vollständige Auswertung aller im Rahmen dieser Arbeit angefertigten **Ser(TO)**-markierten DNA-Sonden befindet sich im Anhang (Tabelle 8.5.1).

Tabelle 4.6.6: Exemplarische Sequenzkontexte und Fluoreszenzanstiege der Analyse von jeweils zwei benachbarten Nukleotiden.

Sequenz, X = Ser(TO)	Länge / Nt	5'-Nukleotide		Ser(TO)	3'-Nukleotide		I/I ₀
		2	1		1	2	
TCC ATX TTTCAATTATTTTCT	19	A	T	X	T	T	6.9
TCTATTTTTCATC ATX TTCA	19	A	T	X	T	T	7.2
ACCG ATX TTGTTCCAGAAC	19	A	T	X	T	T	10.9
TCCATTTTCATT ATX TTCT	19	A	T	X	T	T	17.6
GGCCGCCG TTX TTTCCTG	17	T	T	X	T	T	8.7
GGTTTCAG TTX TTATGCCGTTGTATTT	27	T	T	X	T	T	10.6
CAG TTX TTATGCCGTTG	17	T	T	X	T	T	11.5
TCCATTTTCATT X TTTTCT	19	T	T	X	T	T	22.7
GGCCGCC GX TTTTTCCTG	17	C	G	X	T	T	6.8
CAGCC GX TTTTTCGTG	15	C	G	X	T	T	6.9
CT CGX TTCAATAACTTGCAGT	21	C	G	X	T	T	9.1
AC CGX TTTTGTTCCAGAAC	19	C	G	X	T	T	9.1
CAGTT ATX ATGCCGTTG	17	A	T	X	A	T	1.5
GGTTTCAGTT ATX ATGCCGTTGTATTT	27	A	T	X	A	T	1.6
CGGATTA AAATX ATATGC	17	A	T	X	A	T	2.2

Bedingungen: 1 Äq. Sonde und 5 Äq. vollständig komplementäre Ziel-RNA bei Zugabe, in PBS; $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

4.6.7 Diskussion

Durch die hier etablierte, effiziente Methode zum Chromophor-*Screening* in DNA-FIT-Sonden konnten zwei Kandidaten (CV und CB) identifiziert werden, welche hervorragende Fluoreszenzanstiege bei Hybridisierung mit komplementärer RNA zeigen. CB besitzt zudem noch eine große absolute Intensität. In einem Vergleich von TO und CB konnte gezeigt werden, dass der Einbau von LNA die Fluoreszenzintensität und Helligkeit beider Chromophore deutlich vergrößert. Mittels LNA/2'-O-Me-modifizierter 1-Nt-Abstand-Sonden konnte die bisher größte Leistungsfähigkeit einfach intern-markierter Sonden erreicht werden. Für TO wurde eine bis zu 51-fache Fluoreszenzintensivierung erzielt werden. Die maximale Responsivität des CB lag bei $I/I_0 = 195$. Durch Quantenausbeuten von 0.45-0.47 zeigten die CB-markierten Sonden eine große Helligkeit und empfehlen sich für zukünftige Lebendzell-Untersuchungen. Die Kombination mit LNA könnte ebenfalls die Nützlichkeit von CV deutlich erhöhen, jedoch steht solch eine Untersuchung bisher aus. Die Kombination von BO-, TO- und CB-markierten Sonden ermöglichte die simultane, sequenzspezifische Detektion drei verschiedener Ziel-RNAs. Falsch-positive Ergebnisse durch die Zugabe nicht-komplementärer RNA wurden dabei nicht beobachtet. Ferner zeigte die kombinierte Verwendung der drei Chromophore keine signifikante Interferenz ihrer Farbkanäle.

Die Farbstoffe CV und CB wurden zuvor von Rémy *et al.* über lange Alkylketten (C₈ oder länger) an das 5'-Ende oder an ein Phosphatrückgrat in Oligonukleotide eingebaut, zeigten jedoch bei Hybridisierung nahezu keine Responsivität.^[238] Da in diesem Sondendesign keine Nukleobase ersetzt wurde, muss vermutet werden, dass die Farbstoffe aus sterischen Gründen nicht im Basenstapel interkalieren konnte. Strukturell ähnliche Farbstoffe, basierend auf weiteren Heteroaromaten (S, O, N, Se), halogenierten Heteroaromaten sowie längeren Methinbrücken wurden von Okamoto *et al.* über lange Alkyl linker in *ECHO-Probes* eingebaut, um nahezu den gesamten sichtbaren und nahen IR-Bereich abzudecken.^[176, 182, 243] Durch die Verwendung zweier Chromophore, welche in Abwesenheit von komplementärem Target

durch Aggregation gelöscht werden, wurden stets responsive Sonden erhalten. Jedoch zeigten die meisten Chromophore geringe Leistung (Responsivitäten und Fluoreszenzintensität) als das weit verbreitete TO. Eine Ausnahme stellten hierbei die Chromophore mit längeren Methinbrücken (C₃-C₅) dar. Durch die relativ große Quantenausbeute der freien Farbstoffe, profitieren diese besonders stark von der Aggregation. Die Kombination aus effizienten Löschemechanismen sowie eine großen Quantenausbeute ermöglichte hervorragende Fluoreszenzeigenschaften *in vitro*.^[176, 182] Die meisten Farbstoffe wurden bisher jedoch nicht zur RNA-Detektion in Zellen angewendet, möglicherweise aufgrund der Anfälligkeit der *ECHO-Probes* gegenüber Selbstkomplementarität und der dramatischen Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften vom Sequenzkontext.

Die Untersuchungen von Okamoto legen jedoch nahe, dass ebenfalls in FIT-Sonden die Verwendung von zwei TR-Chromophoren zu responsiven Sonden führen könnte. Wie es bereits für die Verwendung mehrerer TO-Einheiten gezeigt wurde (Kapitel 4.3), sollten zwei TR-Einheiten im Einzelstrang durch Aggregation gelöscht werden und durch hybridisierungsinduzierte Separierung der Chromophore eine deutliche Fluoreszenzintensivierung erfahren.

Durch die hier gezeigte vereinfachte Synthesestrategie sowie eine bessere Vorstellung der idealen Sequenzumgebung sollte die Planung und Synthese zukünftiger FIT-Sonden deutlich erleichtert werden und könnte andere Anwender zur Synthese und Anwendung der FIT-Sonden motivieren.

4.7 RNA-Editierung

Eine weitere wichtige Eigenschaft von FIT-Sonden, welche in dieser Arbeit bislang nicht behandelt wurde, besteht in ihrer Einzelbasenspezifität. Während Einzelbasenmutationen z.B. in der PCR von zahlreichen Sondenkonzepten (unter anderem auch von FIT-PNA^[189]) detektiert werden können, wurden Einzelnukleotidunterschiede im Rahmen der RNA-Editierung bisher nicht mit Fluoreszenzsonden untersucht. RNA-Editierung ist ein biochemischer Prozess der post-transkriptionalen enzymatischen Umwandlung spezifischer Nukleotiden innerhalb der RNA. Weit verbreitet ist dabei die Transaminierung von Adenin zu Inosin und Cytidin zu Uridin (Abb. 4.7.1A). Dementsprechend werden diese Umwandlungen als A-zu-I- bzw. C-zu-U-Editierung bezeichnet. Im Gegensatz zu genomischen Mutationen kann die RNA-Editierung in Ratio (von 0% bis zu 100%) auftreten. Auch wenn viele biologische Fragen über den evolutionären Ursprung, den Ablauf und die Bedeutung der RNA-Editierung bisher nicht geklärt wurden, werden besonders bei der C-zu-U-Editierung zwei biologische Konsequenzen häufig in der Literatur diskutiert. So kann die Umwandlung von C-zu-U im Basentriplett, welches für Glutamin codiert (CAA), zu einem Stopp-Codon (UAA) führen. Die Folge ist eine unvollständige Translation, sodass verkürzte und ggf. funktionslose Proteine entstehen. Andererseits kann das ACG-Codon zu AUG, dem Start-Codon, umgewandelt werden, welches die Translation initiiert, sodass zusätzlich längere oder kürzere Proteine synthetisiert werden (Abb. 4.7.1.B) bzw. die Editierung notwendig ist um die Expression zu regulieren. Bei der A-zu-I-Editierung könnte hingegen eine Basenpaarung von Inosin und Cytosin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken generiert werden.

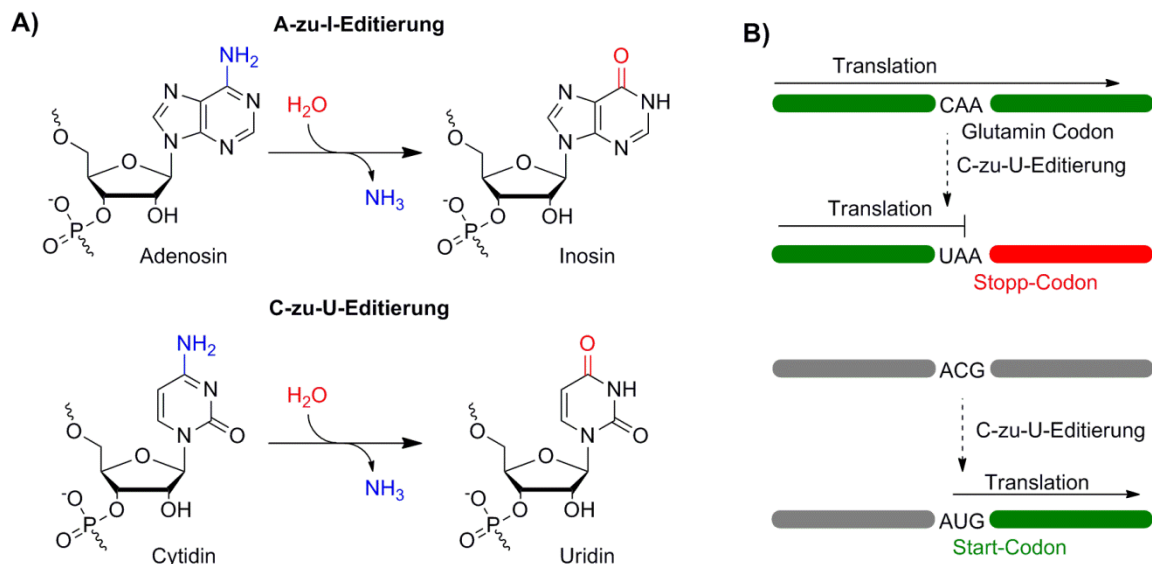


Abbildung 4.7.1: A) Schematische Darstellung der RNA-Editierung. B) Mögliche Folgen der C-zu-U-Editierung für die Proteinbiosynthese.

Da die RNA-Editierung einen Einfluss auf die Proteinexpression nehmen kann, ist zu erwarten, dass die möglichen biologischen Ursachen und Folgen äußerst vielfältig sind. Bisher wurde die RNA-Editierung hauptsächlich durch Sequenzierungsmethoden untersucht. Um den Editierungsprozess in Zellen zu visualisieren und daran beteiligte Proteine zu

identifizieren, werden hoch-spezifische Sonden benötigt, welche editierte von nichteditierter RNA unterscheiden können. Da FIT-Sonden besonders zur Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen in Nachbarschaft des Reporters geeignet sind, sollte ebenfalls die Detektion von RNA-Editierung gelingen.

4.7.1 Vorüberlegungen zur Detektion von RNA-Editierung

Um den Editierungsprozess auf molekularer Ebene in zeitlicher und räumlicher Abhängigkeit zu untersuchen, sollen editierte neben nicht nicht-editierter RNA in Zellen detektiert werden. Dazu werden zwei spektral unabhängige Reporter benötigt, welche die duale, sequenzspezifische RNA-Detektion erlauben (Abb. 4.7.2). Eine Sonde sollte komplementär zur editierten RNA sein, die Zweite komplementär zur nicht-editierten RNA. Beide sollten jeweils bei Hybridisierung mit komplementärer Ziel-RNA ein starkes Fluoreszenzsignal liefern, während bei Hybridisierung mit der jeweils anderen, Einzelbasen-fehlgepaarten RNA kein bzw. nur ein geringes Fluoreszenzsignal auftreten sollte.

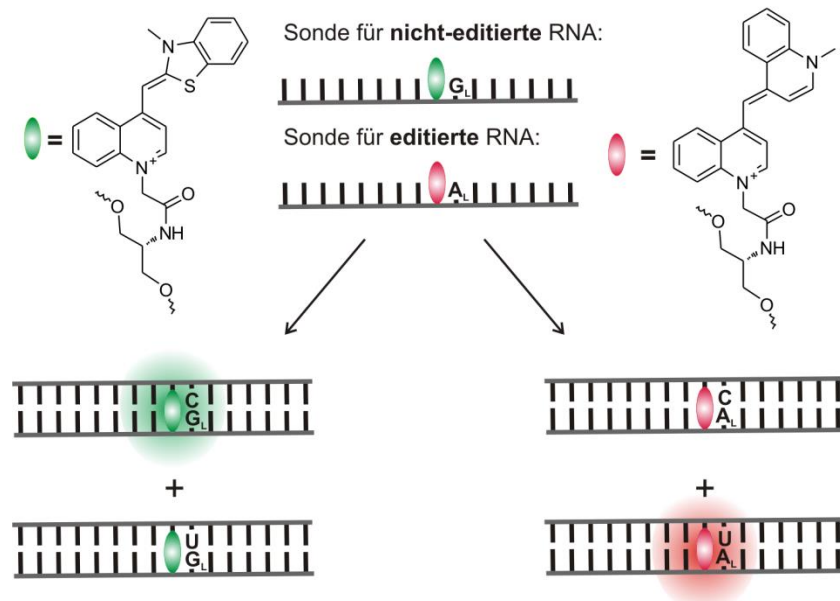


Abbildung 4.7.2: Schematische Darstellung einer möglichen Kombination aus FIT-Sonden zur Detektion von editierter neben nicht-editierter RNA.

Die simultane Detektion mehrerer Ziel-RNAs wurde bereits in Kapitel 4.6.5 erfolgreich demonstriert und sollte nun auf andere Sequenzen übertragen werden. Zur Detektion der RNA-Editierung wurden die Farbstoffe TO und CB ausgewählt, da diese zum einen die größte Leistungsfähigkeit hinsichtlich der Intensität des Fluoreszenzsignals und der Responsivität zeigten und zum anderen die spektrale Überlappung von TO und CB besonders gering ausfällt. Da die Fluoreszenzeigenschaften beider Farbstoffe eine starke Abhängigkeit vom Sequenzkontext aufweisen, bieten sich folgende Optionen zur Sondenoptimierung an: 1) der Reporter kann jeweils 3' oder 5' zur Editierungsstelle platziert werden, sodass zwei verschiedene Sequenzkontexte zur Verfügung stehen. 2) Beide Reporter können wahlweise in die komplementäre Sequenz zur editierten bzw. nicht-editierten RNA eingebaut werden, sodass die beste Kombination beider Farbstoffe ausgewählt werden kann. 3) Da LNA nicht

nur eine deutliche Verbesserung der Quantenausbeute von FIT-Sonden bewirkt, sondern ebenfalls eine vergrößerte Selektivität gegenüber Einzelbasenfehlpaarungen aufweist,^[70] erschien es zweckmäßig eine LNA-Modifikation benachbart zum Reporter und gleichzeitig gegenüber der Editierungsstelle zu untersuchen. Im Folgenden wurden zwei biologisch-relevante Beispiele zur C-zu-U-Editierung untersucht.

4.1.1 Detektion der C-zu-U-Editierung von *Nicotiana tobaccum* NADH-Dehydrogenase

NADH-Dehydrogenase (*Ndh*) von *Nicotiana tobaccum* ist eines der seltenen literaturbekannten Beispiele in dem die post-transkriptionale RNA-Editierung von C zu U mit ca. 50% auftritt und dadurch ein Startcodon (AUG) aus ACG formt, wodurch der Leserahmen der Proteinbiosynthese verschoben wird.^[244] Diese Editierung ist notwendig um die intakte Untereinheit der NADH-Dehydrogenase innerhalb der Chloroplasten zu erhalten.^[245, 246] Die molekularbiologischen Ursachen und der Ablauf der Editierung an exakt dieser Stelle sind bisweilen unklar, jedoch wurden einige Proteine identifiziert, welche am Editierungsprozess beteiligt sein könnten.^[247] Durch die simultane Detektion von editierter bzw. uneditierter RNA sowie die Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine sollte es möglich sein, einen detaillierten Einblick in die Protein-RNA-Wechselwirkungen während des Editierungsprozess zu erhalten.

Den Vorüberlegungen folgend stehen für diese Ziel-RNA die Sequenzkontexte „T-X-G/A“ (Reporter befindet sich 5' zur Editierungsstelle) bzw. „G/A-X-A“ (Reporter befindet sich 3' zur Editierungsstelle) zur Auswahl (Abb. 4.7.3). Beide Sequenzkontexte erschienen bei weitem nicht ideal für TO, jedoch sollte nach der Sequenzanalyse (Kapitel 4.6.4) die Kombination von Purin und Pyrimidin bessere Ergebnisse liefern als die zweier Purine, weshalb lediglich der Sequenzkontext „T-X-G/A“ ausgewählt wurde.

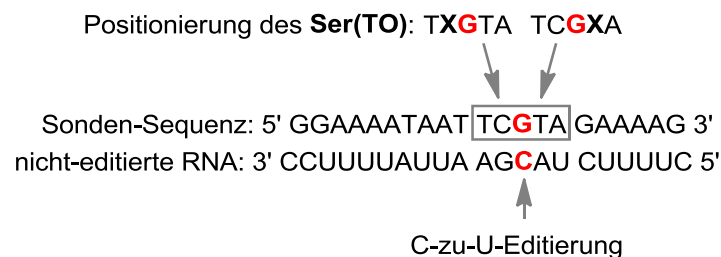


Abbildung 4.7.3: Beispiel zur Positionierung des **Ser(TO)** zur Detektion von RNA-Editierung.

Mit der vormalig beschriebenen Methode zur post-DNA-synthetischen Markierung **Ser(NH₂)**-modifizierter Sonden (Kapitel 4.6.2), wurden CB- und TO-markierte DNA- und LNA-Sonden dargestellt (Tabelle 4.7.1). Die Sonden wurden anhand ihres Chromophores, ihrer DNA- bzw. LNA-Modifikation und Ziel-RNA bezeichnet (ed = komplementär zur editierten RNA; un = komplementär zur nicht-editierten RNA). Die Synthese der Sonden sowie die Kupplung der Chromophore in Lösung verliefen wie vormalig beschrieben (Kap. 4.6.2) in guten Ausbeuten. Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften wurden die Sonden zunächst mit komplementärer (*match*, *I_m*) und einzelfehlgepaarter RNA (*mismatch*, *I_{mm}*) hybridisiert (Tabelle 4.7.1). Wie erwartet zeigten die DNA-TO-Sonden in diesem Sequenzkontext nur sehr geringe

Responsivität mit komplementärer RNA ($I/I_0 = 1.1-1.9$). Der Einbau von LNA resultierte in verbesserten, jedoch nur moderaten Fluoreszenzanstiegen ($I/I_0 = 2.9-4.6$). Bei Hybridisierung mit fehlgepaarter RNA wurde quasi kein Fluoreszenzanstieg verzeichnet, sodass die Diskriminierung ($D = (I_m - I_0)/(I_{mm} - I_0)$) von komplementärer zu fehlgepaarter RNA signifikant war. Negative Werte für D zeigen, unabhängig von der Größe des Wertes, die „perfekte Diskriminierung“ an, da die Fluoreszenzintensität bei Hybridisierung mit fehlgepaarter RNA unterhalb der Emission in Abwesenheit von RNA liegt (siehe **ndhd-TO-DNA-ed** und **ndhd-CB-DNA-ed**). Die CB-markierten Sonden zeigten deutlich bessere Fluoreszenzeigenschaften. Die Kombination mit LNA zeigte erwartungsgemäß deutlich vergrößerte Fluoreszenzintensitäten. Aufgrund des niedrigen Signals im Einzelstrang stieg die maximale Responsivität auf $I/I_0 = 48$. Wie bereits für TO wurde eine deutliche Diskriminierung von komplementärer gegenüber Einzelbasen-fehlgepaarter RNA erzielt.

Tabelle 4.7.1: Sonden und deren Fluoreszenzeigenschaften zur Detektion von *ndhd*-Editierung.

ndhd-	Sequenz ^a , X = Ser(TO), Y = Ser(CB)	I_0	match		mismatch		D^b
			I_m	I/I_0	I_{mm}	I/I_0	
TO-DNA-ed	GGAAAATAATTXATAGAAAAG	19.0	20.5	1.1	18.7	1.0	-5
TO-LNA-ed	GGAAAATAATTX _L ATAGAAAAG	12.9	38.0	2.9	13.8	1.1	30
TO-DNA-un	GGAAAATAATTXGTAGAAAAG	11.2	21.0	1.9	11.8	1.1	15
TO-LNA-un	GGAAAATAATTX _L GTAGAAAAG	8.1	37.4	4.6	15.6	1.9	4
CB-DNA-ed	GGAAAATAATTYATAGAAAAG	1.9	6.0	3.2	1.7	0.9	-34
CB-LNA-ed	GGAAAATAATTY _L ATAGAAAAG	1.5	36.8	24.5	2.3	1.5	45
CB-DNA-un	GGAAAATAATTYGTAGAAAAG	1.3	20.7	16.4	1.4	1.1	131
CB-LNA-un	GGAAAATAATTY _L GTAGAAAAG	1.0	48.5	48.3	5.2	5.2	11
RNA-ed	CUUUUCUAUGAAUUUUUCC						
RNA-un	CUUUUCUACGAAUUUUUCC						

[a] tiefgestelltes „L“ = LNA-Nukleotid [b] $D = \text{Diskriminierung} = (I_m - I_0)/(I_{mm} - I_0)$. Die grau-hinterlegten Sonden wurden zur simultanen Detektion beider RNAs verwendet. Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. entsprechender Ziel-RNA bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7); TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$; CB: $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 610 \text{ nm}$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Die vielversprechendste Kombination hinsichtlich Diskriminierung, Fluoreszenzanstieg und -intensität (**ndhd-CB-LNA-un** und **ndhd-TO-LNA-ed**) wurde anschließend in einem Zweifarbexperiment untersucht. Die Mischung beider Sonden wurde vorgelegt und mit editierter bzw. nicht-editierter Ziel-RNA versetzt. Die Zugabe von **ndhd-RNA-un** führte zu einem 38-fachen Anstieg der CB-Fluoreszenz, während die TO-Fluoreszenz nahezu unverändert blieb (Abb. 4.7.4A). Die unterschiedlichen Werte des Fluoreszenzanstiegs im Vergleich zu Tabelle 4.7.1. ergeben sich durch eine geringe Interferenz beider Sonden in derselben Küvette sowie durch die reduzierte Konzentration der Sonden und Ziel-RNA. Wurde zur Mischung der Sonden nur die **ndhd-RNA-ed** zugegeben, so stieg das TO-Signal um den Faktor 3.2 an. Ebenfalls das CB-Signal erfuhr eine leichte Intensivierung. Zwar sieht der 6.3-fache Fluoreszenzanstieg dramatisch gegenüber dem Anstieg des TO-Signals ($I/I_0 = 3.2$) aus, jedoch war die absolute Intensität des CB-Signals immer noch gering (Abb. 4.7.4B).

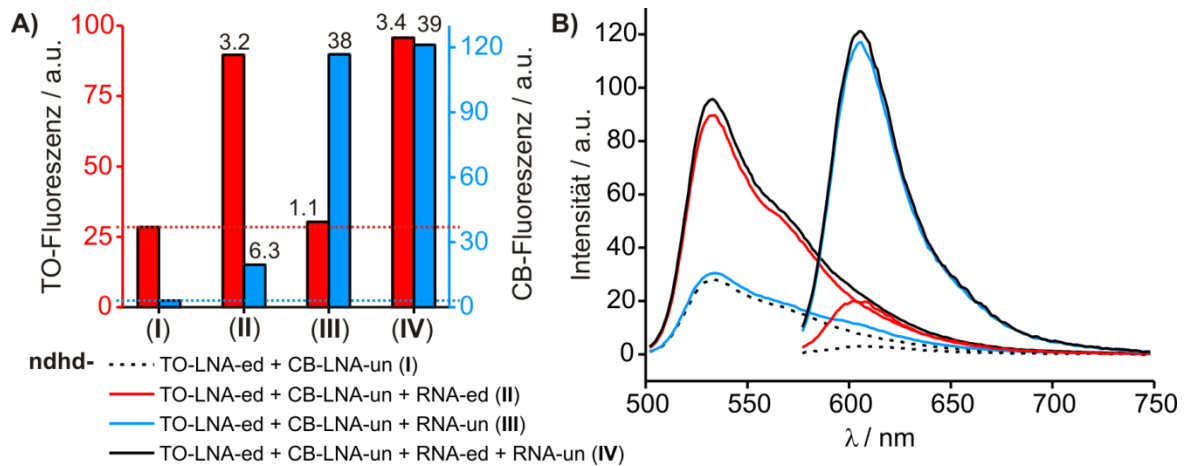


Abbildung 4.7.4: A) Fluoreszenzintensitäten und -anstiege (Zahlen über Balken) TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 535$ nm; CB: $\lambda(\text{ex}) = 560$ nm, $\lambda(\text{em}) = 610$ nm sowie B) vollständige Emissionsspektren des Zweifarbexperiments vor und nach Zugabe von Ziel-RNA laut Legende. Bedingungen: 0.2 μM beider Sonden und entsprechende Ziel-RNA bei Zugabe, in PBS; Emissionskurven: TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500$ -750 nm; CB: $\lambda(\text{ex}) = 560$ nm, $\lambda(\text{em}) = 575$ -750 nm; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 10 nm, 37 °C.

Wurde die jeweils andere RNA zur Mischung der Sonden und der ersten RNA hinzugegeben, so wurde ebenfalls ein Intensitätsanstieg des zweiten Farbstoffs detektiert. Diese Untersuchung zeigte eindrucksvoll, dass die simultane Detektion von editierter und nicht-editierter RNA mittels FIT-Sonden und zwei verschiedener Farbkanäle – selbst bei schwierigen Sequenzkontexten – erfolgreich durchgeführt werden kann. Zusätzlich zeigten beide Farbstoffe vergleichbare Fluoreszenzintensitäten, wodurch die simultane Detektion in zellulären Anwendungen erleichtert werden sollte. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitz-Linneweber (Institut für Biologie, HU-berlin) sollen zukünftig die geeigneten LNA-modifizierten Sonden zur Detektion von RNA-Editierung in fixierten Zellen von *Nicotiana tabacum* verwendet werden.

4.1.2 Detektion der C-zu-U-Editierung von *Rattus glycinergen* Rezeptor α 3

Während die A-zu-I-Editierung häufig in Säugern aufzufinden ist, beispielsweise bei Serotoninrezeptoren^[248] und Kaliumkanälen,^[249] sind nur wenige Beispiele für die C-zu-U-Editierung bekannt. Das wohl am besten untersuchte Beispiel stellt die Editierung der mRNA von Apolipoprotein B dar,^[250] wodurch ein verkürztes Apolipoprotein synthetisiert wird.^[251] Kürzlich entdeckten Meier *et al.* die C-zu-U-Editierung der Untereinheit $\alpha 3$ des *glycinergen* Rezeptors (*GlyRa3*) von Neuronen in Ratten und Mäusen. Die editierte Isoform *GlyRa3*^{P185L} führt zu erhöhter Glycinsensitivität der Zellen und wurde in Zusammenhang mit einer komplexen, zellulären Antwort auf Hirnläsionen diskutiert.^[252] Auch in diesem Fall wäre es für das Verständnis des Editierungsprozesses hilfreich, wenn dieser in Zellen verfolgt werden könnte. Analog zu den vorherigen Überlegungen wurden FIT-Sonden entworfen, welche durch die nachträgliche Kupplung der Chromophore jeweils mit CB und TO markiert wurden (Tabelle 4.7.2). Als Sequenzumgebung wurde „A/G-X-C“ ausgewählt, da andernfalls der Reporter von zwei Purinbasen flankiert wäre (G-X-A/G), womit in den vorherigen Untersuchungen nur Sonden mit geringer Leistungsfähigkeit erhalten wurden (vgl. Kapitel 4.6.6). Alle Sonden wurden mit einer LNA-Modifizierung gegenüber der Editierungsstelle

und somit 5' des Chromophors ausgestattet. Da ebenfalls die Länge und somit die Affinität zur Ziel-RNA sowie der Abstand der Serinol-Modifizierung zum Ende der Sequenz einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften besitzen, wurden zwei unterschiedliche Sondenlängen (15mere und 18mere) untersucht.

Tabelle 4.7.2: Sonden und deren Fluoreszenzeigenschaften zur Detektion von *GlyRa3*-Editierung.

GlyRa3-	Sequenz ^a , X = Ser(TO), Y= Ser(CB)	I ₀	match		mismatch		D ^b
			I _m	I/I ₀	I _{mm}	I/I ₀	
TO-LNA-ed-1	AATAAACTGAA _L XCAGGGT	15.4	122.6	8.0	9.8	0.6	-19
TO-LNA-ed-2	AATAAACTGAA _L XCAG	11.5	37.3	3.2	11.2	1.0	-82
TO-LNA-un-1	AATAAACTGAG _L XCAGGGT	13.4	171.3	12.7	69.6	5.2	3
TO-LNA-un-2	AATAAACTGAG _L XCAG	10.9	172.4	15.8	12.0	1.1	156
CB-LNA-ed-1	AATAAACTGAA _L YCAGGGT	1.8	22.2	12.7	3.3	1.9	13
CB-LNA-ed-2	AATAAACTGAA _L YCAG	1.3	8.9	6.8	1.7	1.3	21
CB-LNA-un-1	AATAAACTGAG _L YCAGGGT	1.5	34.1	23.4	49.2	33.7	1
CB-LNA-un-2	AATAAACTGAG _L YCAG	2.2	36.7	16.9	5.3	2.4	11
RNA-ed	ACCCUGCUUCAGUUUAUU						
RNA-un	ACCCUGCCUCAGUUUAUU						

[a] tiefgestelltes „L“ = LNA-Nukleotid [b] D = Diskriminierung = $(I_m - I_0)/(I_{mm} - I_0)$. Die grau-markierten Sonden wurden zur simultanen Detektion beider RNAs verwendet. Bedingungen: siehe Tabelle 4.7.1.

Mit Ausnahme der Sonde **GlyRa3-TO-LNA-ed-2** zeigten alle TO-markierten Sonden hervorragende Fluoreszenzeigenschaften bei Hybridisierung mit komplementärer RNA. Es wurden nicht nur große Fluoreszenzanstiege erhalten, sondern ebenfalls auffällig große absolute Intensitäten und Quantenausbeuten von bis zu 0.38 erzielt (hier nicht gezeigt). Die CB-markierten Sonden erzielten bis zu 23-fache Fluoreszenzanstiege, jedoch nur geringe absolute Intensitäten. Anscheinend ist der Sequenzkontext „A/G-X-C“ favorisiert für TO, jedoch weniger gut für CB. Abgesehen von den Sonden **GlyRa3-TO-LNA-ed-2** bzw. **GlyRa3-CB-LNA-ed-2** zeigten alle Sonden eine starke Diskriminierung (mindestens 11-fach) von komplementärer gegenüber Einzelbasen-fehlgepaarter RNA.

Die beiden Sonden **GlyRa3-TO-LNA-ed-1** und **GlyRa3-CB-LNA-un-2** wurden zur simultanen Detektion beider RNAs verwendet (Abb. 4.7.5). Bei Zugabe der jeweils komplementären RNA wurden deutliche Anstiege erzielt ($I/I_0 = 7$ für TO und $I/I_0 = 8$ für CB). Die Leistungsfähigkeit der TO-Sonde war (im Vergleich zu den Werten in Tabelle 4.7.2) nahezu unverändert. Durch die besonders helle TO-Sonde und eine geringe Interferenz beider Farbkanäle wurde das CB-Signal im Einzelstrang vergrößert, weswegen die Responsivität der relativen dunklen CB-Sonde um ca. 50% verringert wurde. Zusätzlich ist auch in diesem Fall ein Einfluss der verringerten Sondenkonzentration nicht auszuschließen (vgl. Kapitel 4.1.1). Dennoch gelang der sequenzspezifische Nachweis beider Ziel-RNAs. Bemerkenswert ist zudem, dass auf beiden Farbkanälen eine perfekte Diskriminierung gegenüber der entsprechenden Einzelbasen-fehlgepaarten RNA erzielt wurde. Bei genauerer Analyse der Emissionsspektren (Abb. 4.7.5 B) wird deutlich, dass die absolute Intensität des TO nahezu doppelt so groß ist wie jene des CB – obwohl die Anregungswellenlänge von CB von 560 nm auf 575 nm verschoben wurde, um vergrößerte Intensitäten zu erhalten.

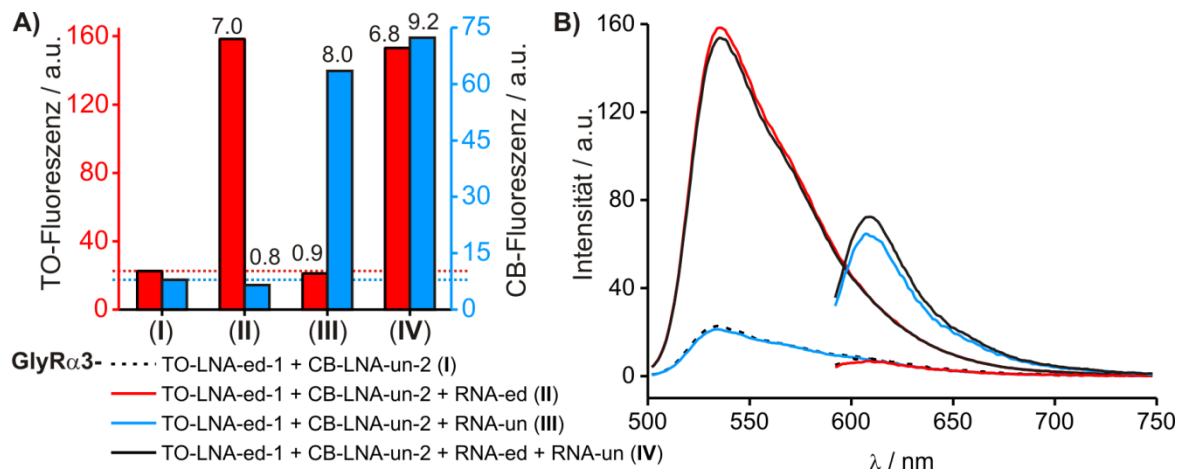


Abbildung 4.7.5: A) Fluoreszenzintensitäten und -anstiege (Zahlen über Balken) TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 535$ nm; CB: $\lambda(\text{ex}) = 575$ nm, $\lambda(\text{em}) = 610$ nm sowie B) vollständige Emissionsspektren des Zweifarbexperiments vor und nach Zugabe von Ziel-RNA laut Legende. Bedingungen: 0.2 μM beider Sonden und entsprechende Ziel-RNA bei Zugabe, in PBS; Emissionskurven: TO: $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}750$ nm; CB: $\lambda(\text{ex}) = 575$ nm, $\lambda(\text{em}) = 590\text{-}750$ nm; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 10 nm, 37 °C.

4.1.3 Diskussion

Durch die kombinierte Verwendung CB- und TO-markierter FIT-Sonden konnte erstmalig die simultane Detektion editierter und nicht-editierter RNA gezeigt werden. Durch die vorgegebene Editierungsstelle kann der Reporter nur auf zwei unterschiedlichen Positionen untersucht werden. Die C-zu-U-Editierung bedingt außerdem, dass mindestens eine Purinbase in Nachbarschaft des Reporters steht. Dies stellte sich in vorherigen Untersuchungen (Kap. 4.6.) als nachteilig für das Auffinden hoch-responsiver Sonden heraus. In diesen Untersuchungen konnte jedoch stets die C-zu-U-Editierung einzelbasenspezifisch detektiert werden.

Im Falle der *NADH-Dehydrogenase* (*ndhd*) wurden gute CB-markierte Sonden erhalten, während die Leistungsfähigkeit der TO-Sonden geringer ausfiel. Dennoch wurde eine circa zehnfache Diskriminierung von komplementärer zu Einzelbasen-fehlgepaarter RNA erhalten. Im Gegensatz dazu wurden zur Detektion der RNA des *glycinergen Rezeptors* (*GlyR α 3*) hervorragende TO-markierte Sonden erhalten. Die CB-markierten Sonden zeigten zwar große Responsivitäten, jedoch war die absolute Intensität dieser Sonde gering. Trotzdem gelang die simultane Detektion von editierter und nicht-editierter RNA, sogar mit perfekter Diskriminierung. In einer Modellstudie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass FIT-Sonden ebenfalls zur Einzelbasendiskriminierung in der A-zu-I-Editierung befähigt sind (siehe Anhang Tabelle 9.6.1 und Abb. 9.6.1).

Diese Untersuchung stellt das erste Beispiel zur Detektion der komplexen Fragestellung der RNA-Editierung mittels Hybridisierungssonden dar. Die erzielten Selektivitäten stellen ausgezeichnete Ergebnisse dar und sind wahrscheinlich in diesem Maße nicht mit anderen Sondenkonzepten zu erzielen. Zwar wurden auch z.B. für MBs Einzelbasen spezifische Untersuchungen gezeigt, jedoch basiert die Selektivität dabei auf der Schmelztemperatur. Es sollte möglich sein MBs so zu designen, dass bei der Experimenttemperatur (≤ 37 °C) nur eine Hybridisierung mit komplementärer, nicht mit fehlgepaarter RNA erfolgt, jedoch würde die

geringe Affinität solcher kurzen Sonden entweder zu unvollständiger Hybridisierung führen oder würde, aufgrund der kurze Schleifenregion, zu Hybridisierung mit weiteren zellulären Sequenzen und somit zu unspezifischen Signalanstiegen führen.

Zusammenfassend konnte mittels *in vitro*-Experimenten die Editierung zweier biologisch-relevanter RNAs untersucht werden. Ob die Leistungsfähigkeit dieser Sonden ebenfalls zur Detektion der RNA-Editierung in fixierten oder lebenden Zellen ausreicht, ist in nachfolgenden Arbeiten zu klären. Zukünftig sollen die *Ndhd*-Sonden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitz-Linneweber (Institut für Biologie, HU-Berlin) sowie die *GlyR3a*-Sonden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jochen Meier (MDC, Berlin-Buch) in waschfreien *FISH*-Experimenten verwendet werden. Besonders bei den Untersuchungen in Pflanzenzellen ist durch die Anwesenheit von Chlorophyllen ein deutlich erhöhtes Hintergrundsignal zu erwarten, wodurch zusätzliche Anforderungen an die Fluoreszenzsonden gestellt werden. Im Rahmen der hier gezeigten Experimente wurden bei weitem nicht alle Parameter optimiert, welche die Fluoreszenzeigenschaften der Sonden beeinflussen, sodass zusätzliche Verbesserungen durch weitere LNA-Modifizierungen, Variation der Sondensequenz und -länge sowie die Verwendung mehrfach-markierter Sonden erzielt werden können.

4.8 F-Tag – Wiederholungssequenzen zur Mehrfarbdetektion transgener RNAs mittels FIT-Sonden

Die Detektion von spezifischen RNAs in Zellen ist in der Regel die Synthese neuer Sonden, komplementärer Sonden erforderlich. Über die Anforderungen an die Stabilität und die Fluoreszenzeigenschaften solcher Sonden hinaus, kann die jeweilige Ziel-RNA die Sequenzwahl limitieren. So konnte in Kapitel 4.4.5 gezeigt werden, dass Hybridisierungssonden mit RNP-bindenden Proteinen konkurrieren und die RNP-Beweglichkeit beeinflussen können. In solchen Fällen wäre die Synthese weiterer Sonden notwendig, welche diese Interferenz vermeiden. Des Weiteren kann mit sequenzspezifischen Sonden nur unter großem Aufwand eine ausreichende Anzahl an Sonden bereitgestellt werden, welche die Detektion einzelner RNA-Moleküle ermöglicht. Die Problematik der Sequenzwahl und Anzahl der Sonden lässt sich durch die Verwendung von Wiederholungssequenzen geschickt umgehen.

Es sind einige Reportersysteme bekannt, die – ähnlich dem MS2-FP-System – sequenzspezifisch Wiederholungseinheiten mit fluoreszenten Fusionsproteinen dekorieren (sogenannte *Tags*, siehe Abb. 4.8.1A). Diese Methoden sind jedoch Regel mit Einschränkungen verbunden. Das MS2-System bietet z.B. eine breite Auswahl verschiedener Fluoreszenzproteine, besitzt aber keine Möglichkeit der Mehrfarbdetektion verschiedener RNAs. Sofern die fluoreszenten Fusionsproteine kein zusätzliches Kernlokalisationsselement tragen, bewirkt die konstante Expression fluoreszenter Fusionsproteine ein erhöhtes Hintergrundsignal.^[129] Ähnliche Systeme basieren auf orthogonalen Erkennungsstrukturen anderer Schleifen-bindender FPs (z.B. λ N-System^[253] oder PP7^[254]) und teilweise auf „Split-Fluoreszenzproteinen“ (z.B. Pumilo), welche das Hintergrundsignal eliminieren, jedoch bleiben die Anforderungen für Mehrfarbdetektion sowie die orthogonale Verwendung von fluoreszenten Fusionsproteinen bestehen.^[255-257]

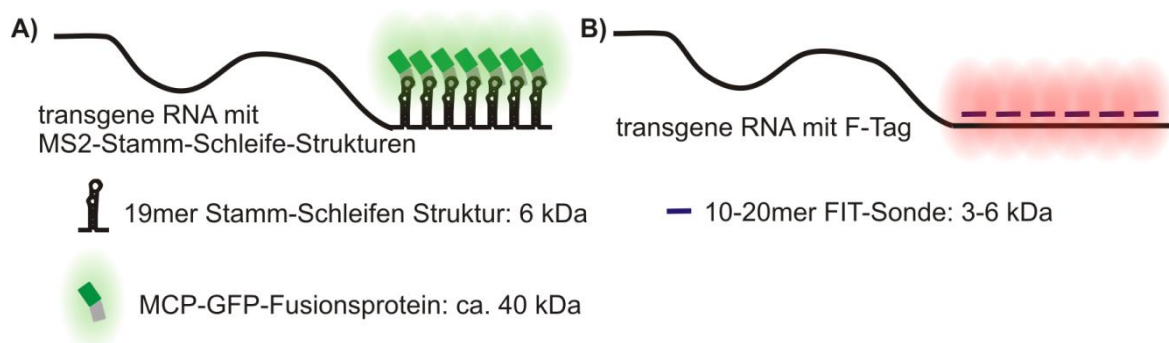


Abbildung 4.8.1: Schematische Darstellung des MS2-FP-Systems (A) und des F-Tags (B).

In diesem Kapitel sollten Wiederholungseinheiten als Zielsequenzen für FIT-Sonden untersucht werden, welche analog zum MS2-FP-System als universelles Werkzeug zur Detektion transgener RNAs verwendet werden könnten (F-Tag, siehe Abb. 4.8.1B). Zum einen könnten diese Wiederholungssequenzen mittels biochemischer Methoden an beliebige RNAs angefügt werden, sodass dieselbe Sonde zur Detektion verschiedener RNAs verwendet werden könnte. Zum anderen sollte die Verwendung von FIT-Sonden gegenüber einer RNA-

Stamm-Schleifenstruktur in Kombination mit fluoreszenten Fusionsproteinen eine deutliche Reduzierung des Molekulargewichts des *Tags* bedeuten, wodurch wiederum eine größere Ähnlichkeit zur Wildtyp-RNA-Mobilität gewährleistet würde.

Basierend auf den zuvor etablierten, unabhängigen Fluoreszenzkanälen von BO-, TO- und CB-markierten Sonden (vgl. Kapitel 4.6.5) sollte im Rahmen dieser Arbeit die benachbarte Hybridisierung mehrerer FIT-Sonden untersucht werden. Neben den bekannten Fluoreszenzkanälen bietet die Verwendung dieser drei Reporter ebenfalls die Möglichkeit von FRET-Prozessen. So wurde aufgrund der Überlappung der Absorptions- und Emissionsspektren ein Energietransfer von BO zu TO sowie von TO zu CB angestrebt (Abb. 4.8.2). Dadurch ergäbe sich die Möglichkeit zur simultanen Detektion fünf verschiedener Zielsequenzen bei Verwendung von lediglich drei Sonden.

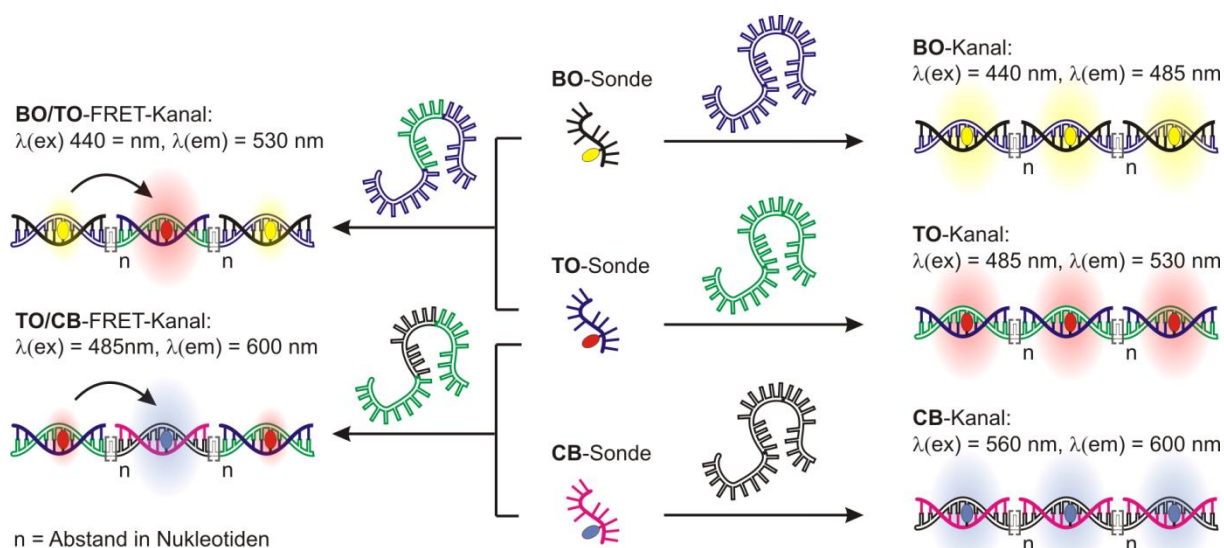


Abbildung 4.8.2: Schematische Darstellung des Prinzips der Detektion von fünf Farbkkanälen in Wiederholungssequenzen unter Verwendung von BO-, TO- und CB-markierten FIT-Sonden.

Die Sonden sollten neben geeigneten Fluoreszenzeigenschaften (große Helligkeit und Responsivität) ebenfalls resistent gegenüber Nukleaseverdau sein und keine Spaltung der Ziel-RNA durch RNase-H induzieren. All diese Anforderungen können durch das in Kapitel 4.4 beschriebene „1-Nt-Abstand-Design“ erfüllt werden, wobei der Effekt von LNA auf BO-markierte Sonden zunächst überprüft werden musste. Um hohe Fluoreszenzintensitäten bei der benachbarten Hybridisierung mehrerer Sonden zu gewährleisten, sollte ebenfalls der Abstand zwischen den einzelnen Bindungsstellen untersucht werden. Größere Abstände sollten hierbei zu größeren Fluoreszenzintensitäten führen, während für effiziente Energietransferprozesse der Abstand zwischen Donor und Akzeptor möglichst gering ausfallen sollte.

Zunächst sollten geeignete BO- und TO-markierte Sonden entworfen werden, welche in einem nachfolgenden Schritt verkürzt und durch 2'-O-Me sowie LNA modifiziert werden, um große Helligkeiten und Nukleaseresistenz zu gewährleisten. Die benachbarte Hybridisierung mehrerer Reporter sollte anschließend mit den bereits optimierten Sonden untersucht werden.

4.8.1 Synthese und Charakterisierung von TO-markierten DNA-F-Tag-Sonden

Die Auswahl der Sequenzen für Wiederholungseinheiten erfolgte nach zwei Kriterien: 1) die Sonden sollten besonders große Responsivität aufweisen und 2) keine Komplementartität zu Segmenten des humanen RNA-Transkripts aufweisen, sodass unspezifisches Signal vermieden wird. Basierend auf den Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften (Kapitel 4.6.6) wurden „gute Positionen“ ausgewählt, zu einem 19mer kombiniert und so arrangiert, dass mittels „Nucleotide-Blast“^[258] keine übereinstimmende Sequenz auf dem humanen Transkript gefunden wurde. Die Sonden wurden nach der bekannten Syntheseprozedur (siehe Kapitel 4.1) dargestellt, gereinigt und analysiert. Die weitere Charakterisierung der Sonden erfolgte anhand der Fluoreszenzeigenschaften sowie der Schmelztemperaturen.

Tabelle 4.8.1: Positionsoptimierung für Ser(TO)-markierte DNA-Sonden.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	T _M / °C	I ₀	I	I/I ₀
F-Tag(TO)-DNA-a	GCGCCXTTGATTAGTTAGC	61	9	73	7.8
F-Tag(TO)-DNA-b	GCGCCGXTGATTAGTTAGC	59	10	99	9.5
F-Tag(TO)-DNA-c	GCGCCGTGXGATTAGTTAGC	61	7	29	3.9
F-Tag(TO)-DNA-d	GCGCCGTTXATTAGTTAGC	60	10	43	4.6
F-Tag(TO)-DNA-e	GCGCCGTTGXTTAGTTAGC	63	14	121	8.8
F-Tag(TO)-DNA-f	GCGCCGTTGAXTAGTTAGC	60	13	67	5.0
F-Tag(TO)-DNA-g	GCGCCGTTGATXAGTTAGC	62	21	29	1.4
F-Tag(TO)-DNA-h	GCGCCGTTGATTXGTTAGC	64	10	51	5.2
F-Tag(TO)-DNA-i	GCGCCGTTGATTAXTTAGC	59	7	54	7.4
F-Tag(TO)-DNA-j	GCGCCGTTGATTAGXTAGC	62	11	132	12.4
RNA(TO)-1	GCUAACUAAUCAACGCGC				

Bedingungen: 0.5 nmol Sonde und 2.5 nmol **RNA(TO)-1** bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C. T_M-Messungen erfolgten bei einer Konzentration von jeweils 1 μM Sonde und Ziel-RNA.

Die Schmelztemperaturen aller Sonden lagen im Bereich von ca. 60 °C. Erneut bestätigte sich die Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften vom Sequenzkontext. So wurden bei Purin 5' des Ser(TO) (**F-Tag(TO)-DNA-c**, **-d**, **-g**, **-h**) geringe Responsivitäten erhalten, während die Sonden **F-Tag(TO)-DNA-b**, **-e** und **-j** starke Fluoreszenzanstiege zeigten.

4.8.2 Untersuchungen zur benachbarten Hybridisierung von FIT-Sonden

Die Verwendung der 19mer-TO-Sonden ermöglicht den Abstand von 19 Nukleotiden bei direkt benachbarter Hybridisierung von zwei oder mehreren Sonden auf den RNA-Wiederholungseinheiten. In einem orientierenden Experiment sollte geklärt werden, ob diese Strategie die Addition der Fluoreszenzemissionen zulässt. Dazu wurden jeweils 0.2 nmol bzw. 0.4 nmol **F-Tag(TO)-DNA-b** vorgelegt und mit einem bzw. zwei Äquivalenten der Ziel-RNA versetzt (Abb. 4.8.3A-C). Die Verdoppelung der Konzentration an Sonde und **RNA(TO)-1** bewirkte erwartungsgemäß die Verdopplung der Signalintensitäten (B), sodass die Responsivität von I/I₀ = 8.4 erhalten blieb. Ähnliches war für die Hybridisierung von 0.2 nmol der doppelt so langen **RNA(TO)-2** mit 0.4 nmol **F-Tag(TO)-DNA-b** zu erwarten (E), sofern kein Selbst-Quenching auftritt. Bei einem Überschuss an Sonde wurde verminderte Responsivität beobachtet (I/I₀ = 5.5), da zu einem Äq. gebundener Sonde die Intensität von

ungebundenen Sonden addiert wurde (C). Interessanterweise wurde bei Verwendung einer äquimolaren Mischung (1:1) von **F-Tag(TO)-DNA-b** und **RNA(TO)-2** eine minimal vergrößerte Responsivität ($I/I_0 = 8.7$) festgestellt (D). Eine mögliche Erklärung könnte der Umstand sein, dass die längere Ziel-RNA einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hat.

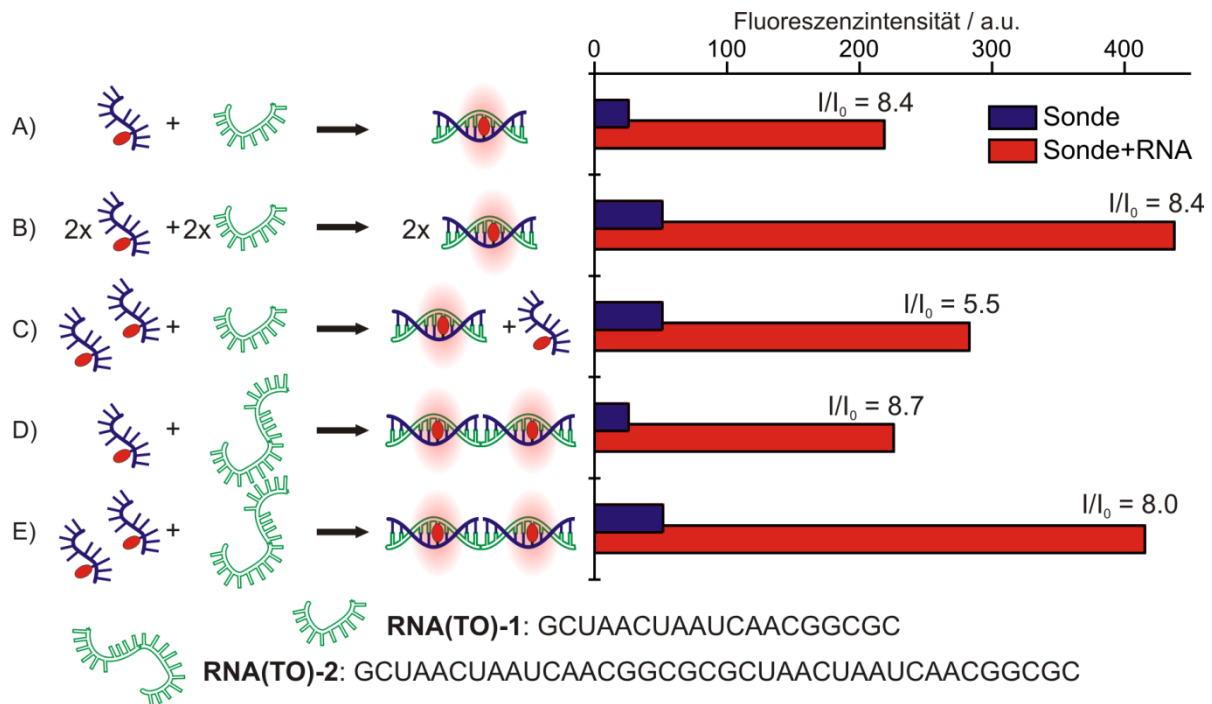


Abbildung 4.8.3: Schematische Darstellung und Vergleich der Fluoreszenzintensitäten und -intensivierungen der einfachen und der benachbarten Hybridisierung zweier Sonden auf einer Ziel-RNA. Bedingungen: 0.2 bzw. 0.4 nmol Sonde (**F-Tag(TO)-DNA-b**) und 0.2 bzw. und 0.4 nmol **RNA(TO)-1** bzw. **RNA(TO)-2** bei Zugabe (siehe Schema), in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 10 nm, 37 °C.

Bei Hybridisierung der Sonde mit **RNA(TO)-2** in stöchiometrischer Mengen (2:1) wurde hingegen eine leicht verminderte Responsivität festgestellt ($I/I_0 = 8.0$, E). Die Fluoreszenzmessungen bei exakter Stöchiometrie unterliegen einem gewissen Fehler, welcher sich zum einen aus dem Pipettierfehler, zum anderen aus der Reinheit der Ziel-RNAs ergibt, sodass eine Abweichung von 5-10% des Fluoreszenzsignals angenommen werden kann. Ebenfalls kann eine Selbst-Löschung auch bei diesem großem Abstand nicht ausgeschlossen werden.

4.8.3 BO-markierte F-Tag-Sonden

Basierend auf den vielversprechendsten TO-Vorläufersonden (**F-Tag(TO)-DNA-b** und **-j**) sollten im nächsten Schritt entsprechende BO-Sonden dargestellt werden, welche neben guten Fluoreszenzeigenschaften ebenfalls einen passenden Abstand für den Energietransfer zu TO besitzen. Die Effizienz des Energietransfers wird hauptsächlich vom Abstand beider Chromophore sowie der relativen Orientierung ihrer Dipolmomente bestimmt. Da für die ternären Komplexe keine genaue Aussage über die Flexibilität und Orientierung getroffen werden konnte, wurde dieser Faktor vernachlässigt. Um einen minimalen Abstand zu gewährleisten, wurden die besten TO-markierten Sonden nahe dem 5'-Ende (**F-Tag(TO)-DNA-b**) bzw. dem 3'-Ende (**F-Tag(TO)-DNA-j**) als Ausgangspunkt gewählt, sodass sich die

Kombination von TO nahe dem 5'-Ende und BO nahe dem 3'-Ende sowie *vice versa* anboten (Abb. 4.8.4). Für alle FIT-Sonden wurde jedoch stets ein Abstand von mindestens drei Nukleotiden zum Ende eingehalten, um die Interkalation in den Basenstapel zu gewährleisten. Untersuchungen der *stammlosen PNA-Beacons* und doppelt-TO-markierten DNA-FIT-Sonden legten nahe, dass bis zu einem Abstand von zehn Nukleotiden ein effizienter Energietransfer gewährleistet sein sollte.^[195, 226]

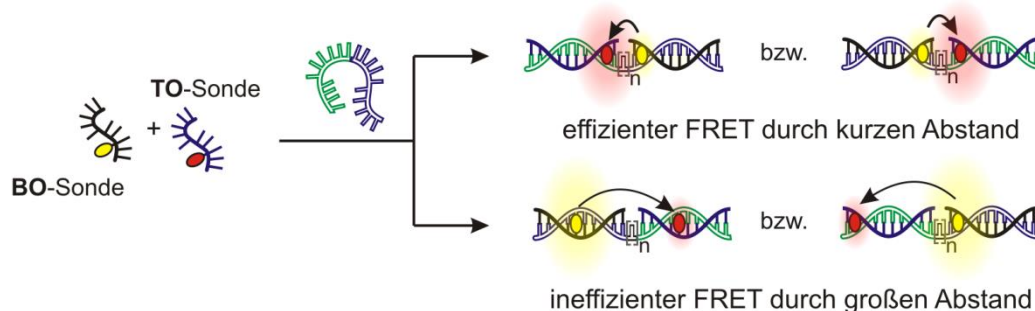


Abbildung 4.8.4: Schematische Darstellung der relativen Positionierung von TO und BO für einen effizienten (oben) bzw. ineffizienten (unten) Energietransfer bei benachbarter Hybridisierung von BO- und TO-Sonden.

Basierend auf diesen Vorüberlegungen und dem Design der TO-Sonden wurde eine 20 Nt-lange Sequenz für BO-Sonden ausgewählt (vgl. **RNA(BO)-1**). Die Sequenzauswahl gestaltete sich deutlich schwieriger als für TO, da bisher nur wenige BO-Sonden untersucht wurden, wovon der Großteil nur geringe Leistungsfähigkeit zeigte (vgl. Kapitel 4.1). Deshalb wurden für **Ser(BO)** sowohl unterschiedliche Sequenzkontexte sowie unterschiedliche Abstände zum Sequenzende untersucht. Dabei eignen sich die Sonden **F-Tag(BO)-DNA-a** bis **g** zum Energietransfer auf **F-Tag(TO)-DNA-j** und die Sonden **F-Tag(BO)-DNA-h** bis **l** zum Energietransfer auf **F-Tag(TO)-DNA-b** (siehe Tabelle 4.8.1). Die Synthese und Charakterisierung von **Ser(BO)**-markierten Sonden erfolgte analog der in Kapitel 4.1 etablierten Prozedur.

Tabelle 4.8.2: Positionsoptimierung für **Ser(BO)**-markierte DNA-Sonden.

Name	Sequenz, Y = Ser(BO)	T _M / °C	I ₀	I	I/I ₀
F-Tag(BO)-DNA-a	GCYAATATGCACGTCCGT	63	11	28	2.6
F-Tag(BO)-DNA-b	CGCYAATATGCACGTCCG	59	11	27	2.4
F-Tag(BO)-DNA-c	GCAYATATGCACGTCCGT	60	17	58	3.5
F-Tag(BO)-DNA-d	GCAAYTATGCACGTCCGT	58	13	51	3.9
F-Tag(BO)-DNA-e	CAAYTATGCACGTCCGTC	62	12	26	2.2
F-Tag(BO)-DNA-f	CAAAYATGCACGTCCGTC	61	12	23	2.0
F-Tag(BO)-DNA-g	CAAATYTGCACGTCCGTC	60	15	21	1.4
F-Tag(BO)-DNA-h	CAAATATGCACGTCYGTC	52	22	22	1.0
F-Tag(BO)-DNA-i	CAAATATGCACGTYCGTC	49	43	45	1.1
F-Tag(BO)-DNA-j	GCAAATATGCACGTYCGT	53	33	51	1.6
F-Tag(BO)-DNA-k	GCAAATATGCACGYCCGT	55	16	112	7.2
F-Tag(BO)-DNA-l	CGCAAATATGCACGYCCG	54	19	93	4.8
RNA(BO)-1	GACGGACGUGCAUUAUUUGCG				

Bedingungen: 0.5 nmol Sonde und 5 Äq. **RNA(BO)-1** bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C. T_M-Messungen erfolgten bei einer Konzentration von jeweils 1 μM Sonde und Ziel-RNA.

Die BO-Sonden zeigten im Allgemeinen geringe Responsivitäten, sodass die beste Sonden mit **Ser(BO)** nahe dem 5'-Ende lediglich einen Anstieg von $I/I_0 = 3.9$ zeigte (**F-Tag(BO)-DNA-d**). Die Positionierung des Reporters nahe dem 3'-Ende zeigte eine größte Responsivität im Sequenzkontext **G-X-C** ($I/I_0 = 4.8$ bzw. 7.2). Der einzige Unterschied der Sonden **F-Tag(BO)-DNA-k** und **F-Tag(BO)-DNA-l** bestand in der Verschiebung der Sequenz um ein Nukleotid. Dies schien ausreichend um einen Zugewinn von 50% in der Fluoreszenzerhöhung zu generieren. Bei genauerer Analyse der Absorptions- und Emissionsspektren wurde deutlich, dass **F-Tag(BO)-DNA-k** im Einzelstrang eine Blauverschiebung der Absorption sowie eine Rotverschiebung der Emission zeigte, welche bei Hybridisierung aufgehoben wurde (siehe Abb. 4.8.5A). Da zur Auswertung die Emissionswellenlänge $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$ gewählt wurde, profitierte die Responsivität hier stark. Das Absorptions- und Emissionsverhalten im Einzelstrang erinnert stark an die Ausbildung von Chromophor-Aggregaten. Da keine Selbstkomplementarität der Sonde vorlag und auch durch Erhitzen und Abkühlen der Lösung, welches zum Aufbrechen von Überstrukturen führen sollte, keine Veränderung der Spektren auftrat, könnte eine excitonische Wechselwirkung zwischen BO und einer Nukleobase bestehen. Solche „Einzel-Chromophor-Exciplexe“ wurden kürzlich ebenfalls für Thiazolorange in strukturierten DNA-Sonden (im sogenannten *i-motif*) von Xu *et al.* berichtet.^[259] Die Sequenzanaloge, um ein Nt verschobene Sonden **F-Tag(BO)-DNA-l** zeigte dieses Verhalten jedoch nicht, sodass die Responsivität geringer ausfiel (Abb.4.8.5B).

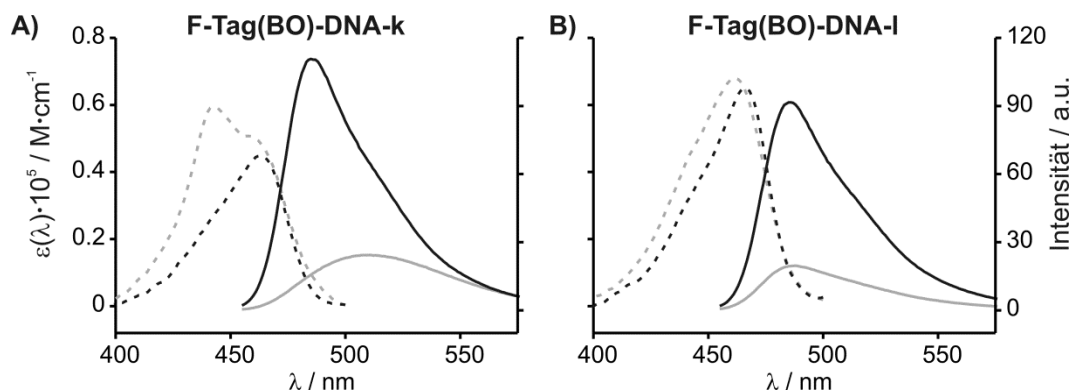


Abbildung 4.8.5: Absorption (gestrichelt) und Fluoreszenzemission (durchgehend) der Sonden **F-Tag(BO)-DNA-k** (A) und **F-Tag(BO)-DNA-l** (B) bevor (grau) und nach der Hybridisierung mit **RNA(BO)-1**. Bedingungen: siehe Tabelle 4.6.2.

Um keine Interferenz durch das rot-verschobene BO-Einzelstrangsignal in späteren Anwendungen zu riskieren, wurde die Sonde **Tag(BO)-DNA-l** für weitere Untersuchungen ausgewählt, wodurch sich die Sonde **F-Tag(TO)-DNA-b** als Partner für einen effizienten FRET ergab (vgl. Abb. 4.8.4).

4.8.4 Nuklease-resistente BO- und TO-Sonden

Um die Sonden **Tag(BO)-DNA-l** und **F-Tag(TO)-DNA-b** in der Lebendzell-Bildgebung einzusetzen und ihre Leistungsfähigkeit weiter zu steigern wurden die Sonden mit LNA sowie 2'-O-Me RNA modifiziert. Zusätzlich wurde die Länge der Sonde auf elf Nukleotide reduziert. Die kürzeren Sonden sollten gleichzeitig mehrere Vorteile kombinieren. So wird das

Molekulargewicht gegenüber dem MS2-FP-System noch einmal deutlich reduziert. Laut der „Blast-Analyse“ konnte auch bei dieser Länge keine potentielle Interferenz mit humanem RNA-Transkript festgestellt werden. Zusätzlich wurde von den verkürzten Sonden ein geringes Hintergrundsignal erwartet, da sie im Einzelstrang weniger stark strukturiert sein sollten, wodurch dem Chromophor eine größere Flexibilität geboten wird. Die Affinität zur Ziel-RNA wurde durch die Verwendung von modifizierten Nukleotiden gewährleistet. Dazu wurden unterschiedliche Anzahlen und Positionierungen von LNA auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht (Tabelle 4.8.3 **F-Tag(TO)-LNA-a-g**). Die optimale Kombination aus Reporter und LNA wurde im nachfolgenden Schritt durch zusätzliche 2'-O-Me-RNA-Modifikationen ergänzt, um maximale Stabilität *in vivo* sicherzustellen.

Der Einbau von LNA führte bei den 11mer TO-Sonden zu einem dramatischen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten. Jede LNA-Sonde emittiert mehr als doppelt so intensiv wie die 11mer DNA-Sonde (**F-Tag(TO)-DNA-k**). Der Fluoreszenzanstieg ist jedoch dramatisch von der Anzahl und Positionierung der LNA abhängig (vgl. Tabelle 4.8.3). Die besten Ergebnisse erbrachte die Kombination von 3'-LNA und einer weiter entfernten Modifikation in 5'-Richtung (**F-Tag(TO)-LNA-f**), während umgekehrt die Kombination aus LNA 5' des **Ser(TO)** sowie die entfernte 3'-LNA-Modifikation (**F-Tag(TO)-LNA-a**) verringerte Leistungsfähigkeit zeigte. Somit diente **F-Tag(TO)-LNA-f** als Vorlage zur Synthese der 1-Nt-Abstand-Sonden, bei denen ein DNA-Nukleotid zwischen TO und 2'-O-Me RNA platziert wurde. Die Synthese der Sonden erfolgte mit einer und zwei LNA-Modifikationen. All diese Sonden zeigten ausgezeichnete Responsivitäten ($I/I_0 = 19-42$) und große Fluoreszenzintensitäten. Jedoch erwies sich erneut die Flankierung des formalen „TO-LNA-Dinukleotids“ durch zwei DNA-Nukleotide als notwendig, um die beste Leistung zu erzielen (**F-Tag(TO)-mix-c** und **-d**). Im Vergleich der jeweils besten DNA-, LNA- und 1-Nt-Abstand-Sonde konnte deutlich die LNA-bedingte Zunahme des Extinktionskoeffizienten und der Emission beobachtet werden (Abb. 4.8.6A-C).

Tabelle 4.8.3: LNA-modifizierte und 1-Nt-Abstand **Ser(TO)**-Sonden.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	T _M / °C	I ₀	I	I/I ₀
F-Tag(TO)-DNA-k	GCCGXTGATTA	44	4	54	15
F-Tag(TO)-LNA-a	GCCG _L XTGAT _L TA	54	8	124	15
F-Tag(TO)-LNA-b	G _L CCGXT _L GATTA	54	11	132	12
F-Tag(TO)-LNA-c	GCCG _L XTG _L ATTA	55	17	170	10
F-Tag(TO)-LNA-d	GCC _L GXTG _L ATT _L A	61	97	172	2
F-Tag(TO)-LNA-e	G _L CCGXT _L GATT _L A	58	22	182	8
F-Tag(TO)-LNA-f	GC _L CGXT _L GATTA	61	7	202	29
F-Tag(TO)-LNA-g	GCCG _L XT _L GATTA	58	37	285	8
F-Tag(TO)-mix-a	<u>GCCGXT_LGATTA</u>	59	6	245	42
F-Tag(TO)-mix-b	<u>GCCGXT_LGATTA</u>	62	9	225	25
F-Tag(TO)-mix-c	<u>GC_LCGXT_LGATTA</u>	69	9	164	19
F-Tag(TO)-mix-d	<u>GC_LCGXT_LGATTA</u>	65	6	224	36

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide. Bedingungen: siehe Tabelle 4.8.1.

4.8. F-Tag – Wiederholungssequenzen zur Mehrfarbdetektion transgener RNAs mittels FIT-Sonden

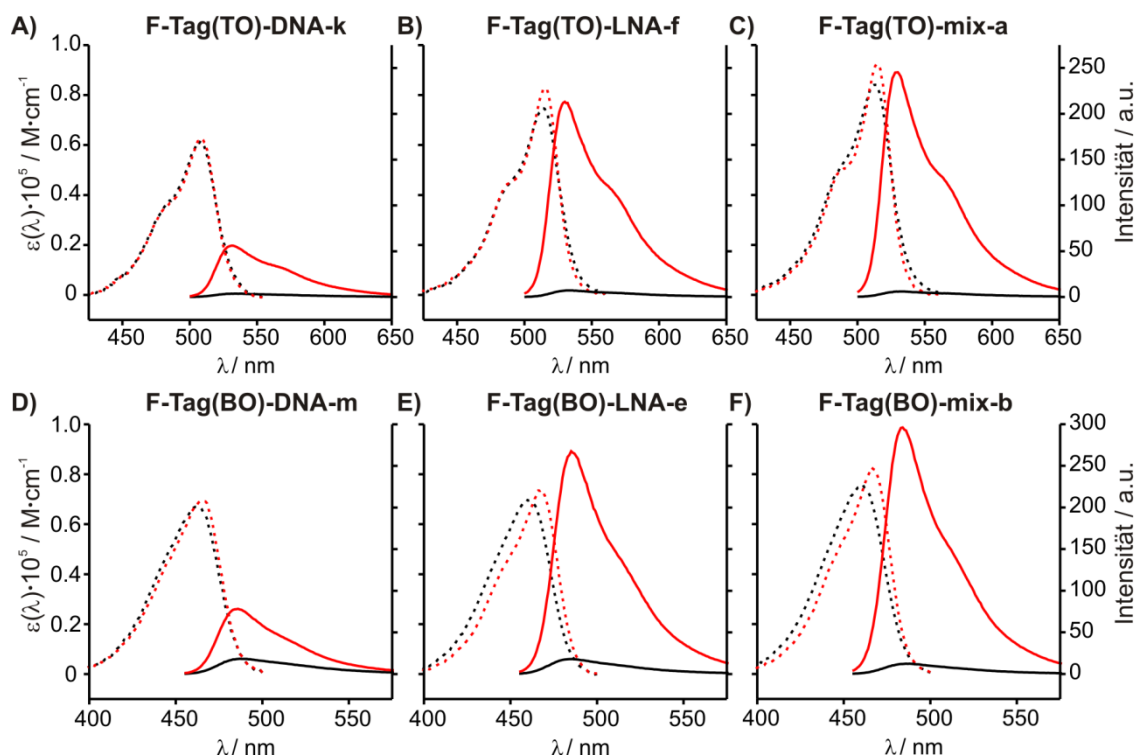


Abbildung 4.8.6: Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgehend) der jeweils angegebenen Sonde in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit (rot) von Ziel-RNA (RNA(TO)-1 bzw. RNA(BO)-1). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. nmol Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, BO: $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}650 \text{ nm}$, TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Tabelle 4.8.4: LNA-modifizierte und 1-Nt-Abstand Ser(BO)-Sonden.

Name	Sequenz ^[a] , Y = Ser(BO)	T _M / °C	I ₀	I	I/I ₀
F-Tag(BO)-DNA-m	ATGCACGYCCG	41	17	75	4
F-Tag(BO)-LNA-a	AT _L GCACG _L YCCG	55	17	164	10
F-Tag(BO)-LNA-b	ATG _L CAC _L G _L YCC _L G	65	26	201	8
F-Tag(BO)-LNA-c	AT _L GCACGYC _L CG	58	17	256	15
F-Tag(BO)-LNA-d	ATG _L CACGYC _L CG	59	24	261	11
F-Tag(BO)-LNA-e	ATGC _L ACGYC _L CG	60	18	268	15
F-Tag(BO)-LNA-f	ATG _L CACG _L YC _L CG	63	39	318	8
F-Tag(BO)-LNA-g	AT _L GCAC _L G _L YC _L CG	68	21	327	16
F-Tag(BO)-mix-a	ATGCACGYC _L CG	62	15	286	19
F-Tag(BO)-mix-b	ATGCACGYC _L CG	62	12	293	24
F-Tag(BO)-mix-c	ATGC _L ACGYC _L CG	69	14	312	22
F-Tag(BO)-mix-d	ATGC _L ACGYC _L CG	66	16	305	19

[a] unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide. Bedingungen: siehe Tabelle 4.8.2.

Ein ähnliches Optimierungsprotokoll wurde für BO-Sonden durchgeführt (Tabelle 4.8.4). Die grundlegende Untersuchung des „LNA-Effekts“ auf BO zeigte die erwarteten Steigerung des Extinktionskoeffizienten, eine dramatische Zunahme der Emission sowie hohe Schmelztemperaturen (vgl. Abb. 4.8.6D-F). Zusammen mit dem verringerten Einzelstrangsignal der 11mer-Sonden konnten erstmals deutlich vergrößerte Responsivitäten ($I/I_0 > 10$) für BO-markierte Sonden erhalten werden. Nach dem für TO bewährten Prinzip wurden die LNA-Modifikationen durch 2'-O-Me-RNA ergänzt, wodurch die Responsivität abermals anstieg. Im Gegensatz zu TO wurden die besten Ergebnisse erhalten, wenn lediglich

ein DNA-Nukleotid 5' des formalen „**Ser(BO)**-LNA-Dinukleotids“ platziert wurde. Das „1-Nt-Abstand-Design“ bestätigte sich somit auch für BO-Sonden als ausgezeichnetes Werkzeug zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften. Die Absorptions- und Emissionsspektren aller hier untersuchten Sonden sind im Anhang (Abb. 9.7.1-9.7.3) abgebildet. Untersuchungen zum Verdau der Sonden-RNA-Duplexe mittels DNase-I bestätigten eine große Stabilität der Mixmere, während LNA allein verminderte Stabilitäten zeigte (siehe Anhang, Abb. 9.7.4).

4.8.5 Benachbarte Hybridisierung

Für die weiteren Untersuchungen wurden die besten Sonden hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und Stabilität (**F-Tag(TO)-mix-a** sowie **F-Tag(BO)-mix-b**) ausgewählt. Zur benachbarten Hybridisierung mehrerer Sonden, ist geringes Einzelstrangsignal von besonderer Bedeutung, während hingegen das Doppelstrangsignal bei der Verwendung von Wiederholungseinheiten keinen limitierenden Faktor darstellen sollte. Jedoch musste überprüft werden, ob die benachbarte Hybridisierung der 11mer-Sonden nicht zur starken Selbst-Löschung führt, wodurch die Responsivität der Sonden und somit der Kontrast in der RNA-Bildgebung verringert würde.

Dazu wurden jeweils zwei Äquivalente **F-Tag(TO)-mix-a** vorgelegt und mit einer stöchiometrischen Menge an Ziel-RNA versetzt (Abb. 4.8.7A-C). Dabei kam als Referenz das 19mer RNA-*Target* (**RNA(TO)-1**) zum Einsatz, worauf nur eine TO-Sonde hybridisieren kann. Des Weiteren wurde die benachbarte Hybridisierung zweier Sonden ohne Basenlücken (**RNA(TO)-3**) und mit einem ungepaarten Nukleotid zwischen den Hybridisierungssequenzen (**RNA(TO)-4**) untersucht. Die direkt benachbarte Hybridisierung (0 Nt-Abstand) der TO-Sonden zeigte eine 36-fache Fluoreszenzintensivierung, während der vergrößerte Abstand durch ein ungepaartes Nukleotid eine geringfügig vergrößerte Fluoreszenzemission zeigte ($I/I_0 = 38$). Die Hybridisierung mit **RNA(TO)-1** lieferte mit $I/I_0 = 42$ den größten Wert, wodurch eine Selbstlöschung von etwa 10% für die benachbarte Hybridisierung auf **RNA(TO)-4** anzunehmen war.

Zur Untersuchung der benachbarten Hybridisierung zweier BO-Sonden (**F-Tag(BO)-mix-b**) wurden ebenfalls die direkte Nachbarschaft (**RNA(BO)-2**) sowie ein ungepaartes Nukleotid (**RNA(BO)-3**) verwendet (siehe Abb. 4.8.7D-F). Als Referenz diente erneut die vormals verwendete 20mer-RNA (**RNA(BO)-1**) auf welcher nur ein Sondenmolekül hybridisieren kann. Auch hier wurden ähnliche Unterschiede in der Responsivität wie bereits für TO festgestellt. So lieferte die direkt benachbarte Hybridisierung der Sonden einen ca. 10% verminderten Fluoreszenzanstieg ($I/I_0 = 18$) gegenüber der Verwendung von **RNA(BO)-1**. Der vergrößerte Abstand und die Zunahme der Flexibilität durch ein ungepaartes Nukleotid verbesserten die Fluoreszenzemission nur unmerklich, sodass die gleiche Responsivität erzielt wurde.

4.8. F-Tag – Wiederholungssequenzen zur Mehrfarbdetektion transgener RNAs mittels FIT-Sonden

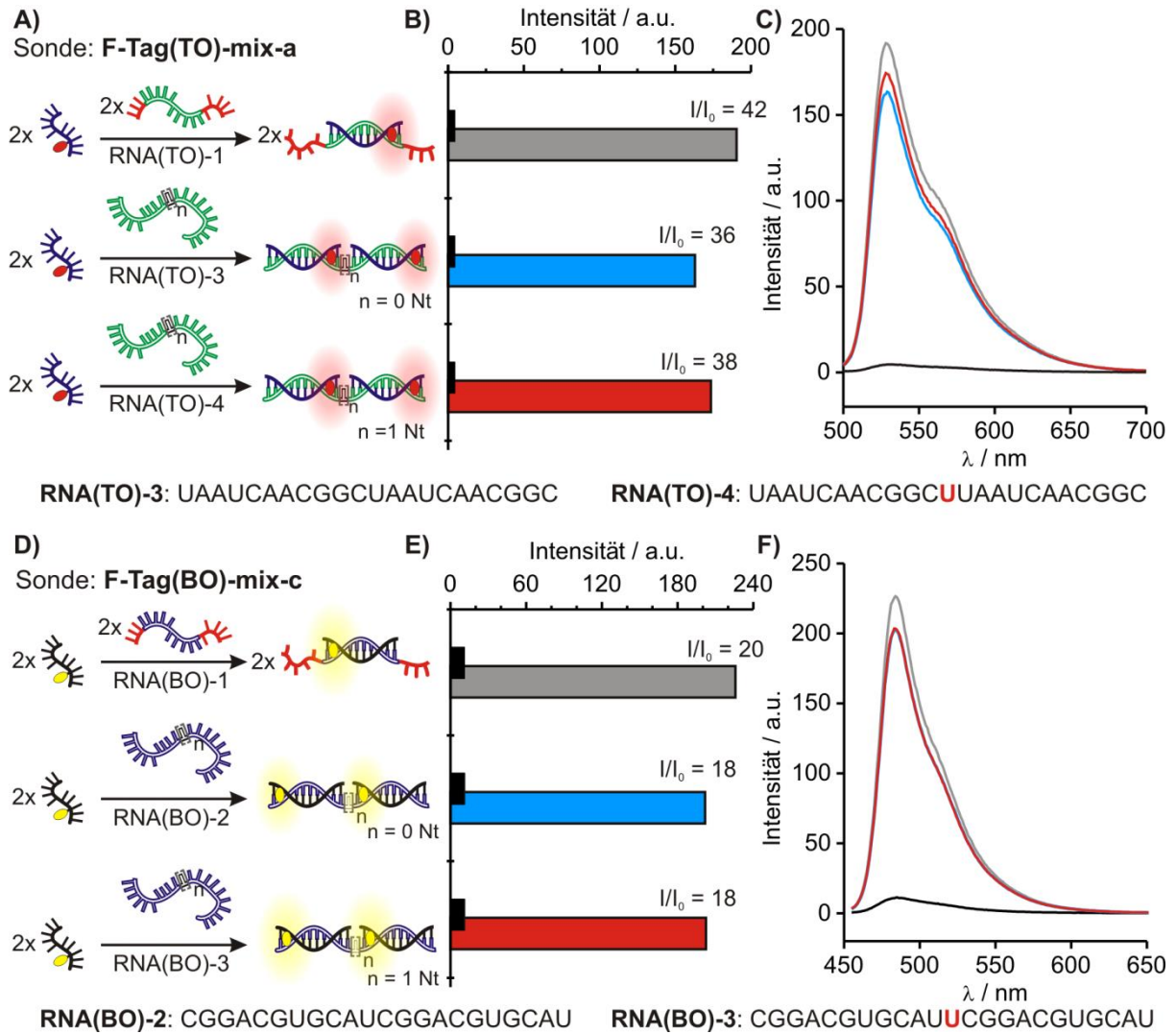


Abbildung 4.8.7: Schematische Darstellung der Hybridisierung (A, D) und Vergleich der Fluoreszenzintensität ($\lambda(\text{em}) = 530 \text{ nm}$ in B, $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$ in E) sowie die vollständigen Fluoreszenzkurven (C, F) bei Hybridisierung zweier TO- bzw. BO-Sonden bei 1 bzw. 0 Nukleotiden Abstand gegenüber der Hybridisierung mit konventioneller Ziel-RNA. Die Farbe der Balken und Emissionskurven sind durch die in A) bzw. D) dargestellten Hybridisierungsexperimente gekennzeichnet. Bedingungen: 0.4 nmol Sonde und 0.4 nmol **RNA(TO)-1** bzw. **RNA(BO)-1** oder 0.2 nmol **RNA(TO)-3**, **RNA(TO)-4** bzw. **RNA(BO)-2**, **RNA(BO)-3** bei Zugabe, in PBS, TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$; BO: $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}50 \text{ nm}$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Die erzielten Fluoreszenzintensivierungen von BO und TO bei benachbarter Hybridisierung un einem Nukleotid Abstand stellen hervorragende Werte dar. Die verminderte Responsivität von maximal 10% sollte keine signifikanten Auswirkungen für die Anwendung dieses Reportersystems in der RNA-Bildgebung haben. Auch wenn als Hauptursache für die verminderte Emission die Selbst-Löschung anzunehmen ist, gestaltete sich die Untersuchung der benachbarten Hybridisierung bei exakter Stöchiometrie als schwierig. Im Gegensatz zu den vorherigen Messungen bei denen in der Regel ein Überschuss an Ziel-RNA eingesetzt wurde, musste bei diesen Experimenten sowohl die Sonden- als auch Ziel-RNA-Menge exakt eingestellt und durch Absorptionsmessungen kontrolliert werden. Dennoch ist ein gewisser Fehler in diesen Experimenten anzunehmen (abgeschätzt mit ca. 5%), da zum einen stets Pipettier- und Messfehler vorliegen können, zum anderen die Reinheit der Ziel-RNA eine

Limitation darstellen kann. Zwar wurden alle Ziel-RNA per Gelelektrophore gereinigt, jedoch zeigte die Analyse per Umkehrphasen-HPLC und Ionenaustauschchromatographie, dass keine 100%-reinen Produkte erhalten wurden. Trotz allem stellten die hier gezeigten Ergebnisse ein hervorragendes Ergebnis dar und empfahlen die Verwendung von einem ungepaarten Nukleotid zur benachbarten Hybridisierung mehrerer BO- bzw. TO-Sonden. Für den Energietransfer von BO zu TO wurden die direkt benachbarte Hybridisierung und somit ein Abstand von sieben Nukleotiden als Ausgangspunkt gewählt. Ein effizienter Energietransfer sollte durch eine starke Verminderung des Donorsignals (BO) und einen deutlichen Anstieg der Akzeptoremission (TO) gekennzeichnet sein. Zur Untersuchung des Energietransfers wurde die BO-Sonde (**F-Tag(BO)-mix-b**) vorgelegt (Abb. 4.8.8, Experiment **Ia**) und mit einem Äquivalent **RNA(BOTO)-1** hybridisiert, wodurch das BO-Signal wie vormals deutlich anstieg ($I/I_0 = 19$) (Abb. 4.8.8, Experiment **Ib**). Die Zugabe von einem Äquivalent der TO-Sonde (**F-Tag(TO)-mix-a**) verminderte die BO-Emission um 91% und generierte einen 49-fachen Anstieg der Emission bei 530 nm (Experiment **Ic**). Im Vergleich zur Responsivität der einzelnen BO- und TO-Sonden ist dieser Wert hervorragend.

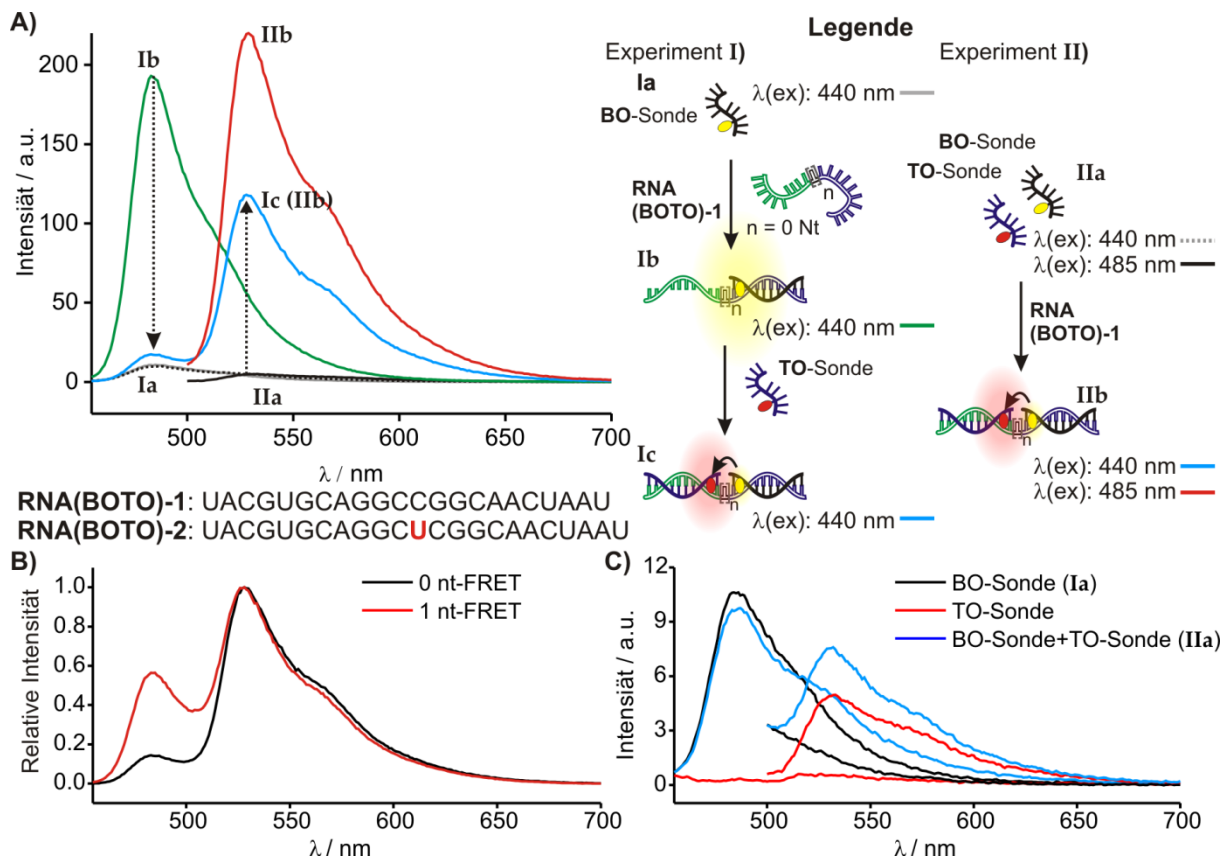


Abbildung 4.8.8: A) Fluoreszenzemissionsspektren bei der Hybridisierung von **F-Tag(TO)-mix-a** sowie **F-Tag(BO)-mix-b** mit **RNA(BOTO)-1**. Die Legende (rechts) zeigt die durchgeführten Experimente zur konsekutiven Hybridisierung der Sonden (Experiment I) sowie die simultane Hybridisierung beider Sonden (Experiment II). Die Farbmarkierungen entsprechen den jeweiligen Emissionskurven unter Anregung bei der angegebenen Wellenlänge. B) Vergleich des FRET-Signals bei direkt benachbarter Hybridisierung sowie einem Nukleotid Abstand. C) Vergleich der Emission der einzelnen Sonden sowie der Mischung beider Sonden im Einzelstrang. Bedingungen: 400 nM je Sonde bzw. **RNA(BOTO)-1**, bei Zugabe, in PBS; BO und FRET: $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}700 \text{ nm}$, TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$ slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Da in dieser Analyse ein mögliches Einzelstrangsignal des TOs bei Anregung von BO außer Acht gelassen wurde, wurde zusätzlich eine Mischung beider Sonden vorgelegt (Abb. 4.8.8 Experiment **IIa**) und mit einem Äquivalent an **RNA(BOTO)-1** hybridisiert (Experiment **IIb**). Die erhaltene Fluoreszenzintensivierung des FRET-Signals verringerte sich dadurch auf $I/I_0 = 25$, da in Abwesenheit von Ziel-RNA bei der Anregungswellenlänge ($\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$) eine schwache Hintergrundfluoreszenz des TO beobachtet wurde (Abb. 4.8.8C). Dies ist konsistent mit der Mehrfarbdetektion in Kapitel 4.6. Der TO-Kanal ($\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$) lieferte in guter Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten einen 33-fachen Fluoreszenzanstieg. Aufgrund der BO-Restemission bei Anregung von TO fällt die maximale Fluoreszenzintensität bei direkter Anregung von TO größer aus als die Emission nach erfolgtem Energietransfer ($\lambda(\text{em}) = 530 \text{ nm}$, $I(\text{TO}) = 220 \text{ a.u.}$ vs. $I(\text{FRET}) = 117 \text{ a.u.}$). Wie bereits erwähnt, sollte durch die Verwendung mehrerer Wiederholungseinheiten die absolute Intensität keinen limitierenden Faktor darstellen. Durch den großen scheinbaren *Stokes-Shift* (95 nm) des FRET-Prozesses sollte die Hintergrundfluoreszenz besonders gering ausfallen. Darüber hinaus wurde durch den FRET eine ausgezeichnete Responsivität gegenüber der Ziel-RNA erhalten, welche sogar größer ausfällt als jene bei alleiniger Verwendung der BO-Sonde. Somit konnten die ersten drei Farbkanäle zur RNA-Detektion durch benachbarte Hybridisierung mehrerer Sonden erfolgreich gezeigt werden.

In einem weiteren Experiment wurde der BO-TO-FRET mit einem Nukleotid Abstand (**RNA(BOTO)-2**) untersucht. Dieser lieferte erwartungsgemäß eine verringerte Effizienz des Energietransfers, welcher durch eine stärkere Restemission von BO sowie einen verringerten Anstieg des TO-Signals gekennzeichnet ist (Abb. 4.8.8B).

4.8.6 Benachbarte Hybridisierung CB-markierter Sonden

Für die Untersuchungen des vierten und fünften Farbkanals (CB und TO-CB-FRET) wurden die Sequenzen der jeweils besten beiden Sonden für **Ser(TO)** und **Ser(BO)** als CB-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden dargestellt (Tabelle 4.8.5). Auf die Darstellung einer zusätzlichen Ziel-Sequenz für CB sollte zunächst verzichtet werden. Gleichzeitig sollte die zuvor festgestellte große Leistungsfähigkeit des **Ser(CB)** eine Optimierung der Positionierung vermeiden, sodass orientierende Untersuchungen mit den bisherigen Zielsequenzen durchgeführt werden können. Für biologische Untersuchungen könnte wahlweise eine BO- oder TO-Sonde durch eine CB-Sonde ersetzt werden.

Die Synthese und Reinigung der CB-markierten Sonden wurde von Jonas Steffen (Arbeitsgruppe Seitz) im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Das CB-Chromophor bewies erneut seine große Leistungsfähigkeit in diesen Sondensequenzen, sodass sehr geringe Einzelstrangsignale sowie starke Fluoreszenzanstiege ($I/I_0 = 95\text{-}143$) verzeichnet wurden. Die beiden zweifach LNA-modifizierten Sonden **CB-F-Tag(BO)-mix-c** und **CB-F-Tag(TO)-mix-d** wurden in der benachbarten Hybridisierung analog zu BO und TO untersucht (Abb. 4.8.9). Für beide Sonden konnte gezeigt werden, dass die konventionellen Ziel-RNAs die größten Fluoreszenzsignale lieferten. Die direkt benachbarte Hybridisierung zeigte eine etwa 10%-

4. Ergebnisse und Diskussion

verringerte Fluoreszenzemission, während die Hybridisierung der Sonden mit einer Basenlücken von einem Nukleotid nur eine ca. 5%-ige Verringerung des Signals bewirkte. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen der benachbarten Hybridisierung zweier TO- bzw. zweier BO-Sonden.

Tabelle 4.8.5: LNA-modifizierte und 1-Nt-Abstand-Ser(CB)-Sonden.

Name	Sequenz ^[a] , Z = Ser(CB)	I_0	I	I/I_0
CB-F-Tag(BO)-mix-b	<u>ATGCACGZC</u> <u>L</u> CG	1.8	171	95
CB-F-Tag(BO)-mix-c	<u>ATGC</u> <u>L</u> <u>ACGZC</u> <u>L</u> CG	1.5	172	117
CB-F-Tag(TO)-mix-a	<u>GCCGZT</u> <u>L</u> GATTA	1.2	165	143
CB-F-Tag(TO)-mix-d	<u>GC</u> <u>L</u> <u>CGZT</u> <u>L</u> GATTA	1.2	167	135

[a] unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide. Bedingungen: 0.5 nmol Sonde und 5 Äq. RNA(TO)-1 bzw. RNA(BO)-1 bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 600 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

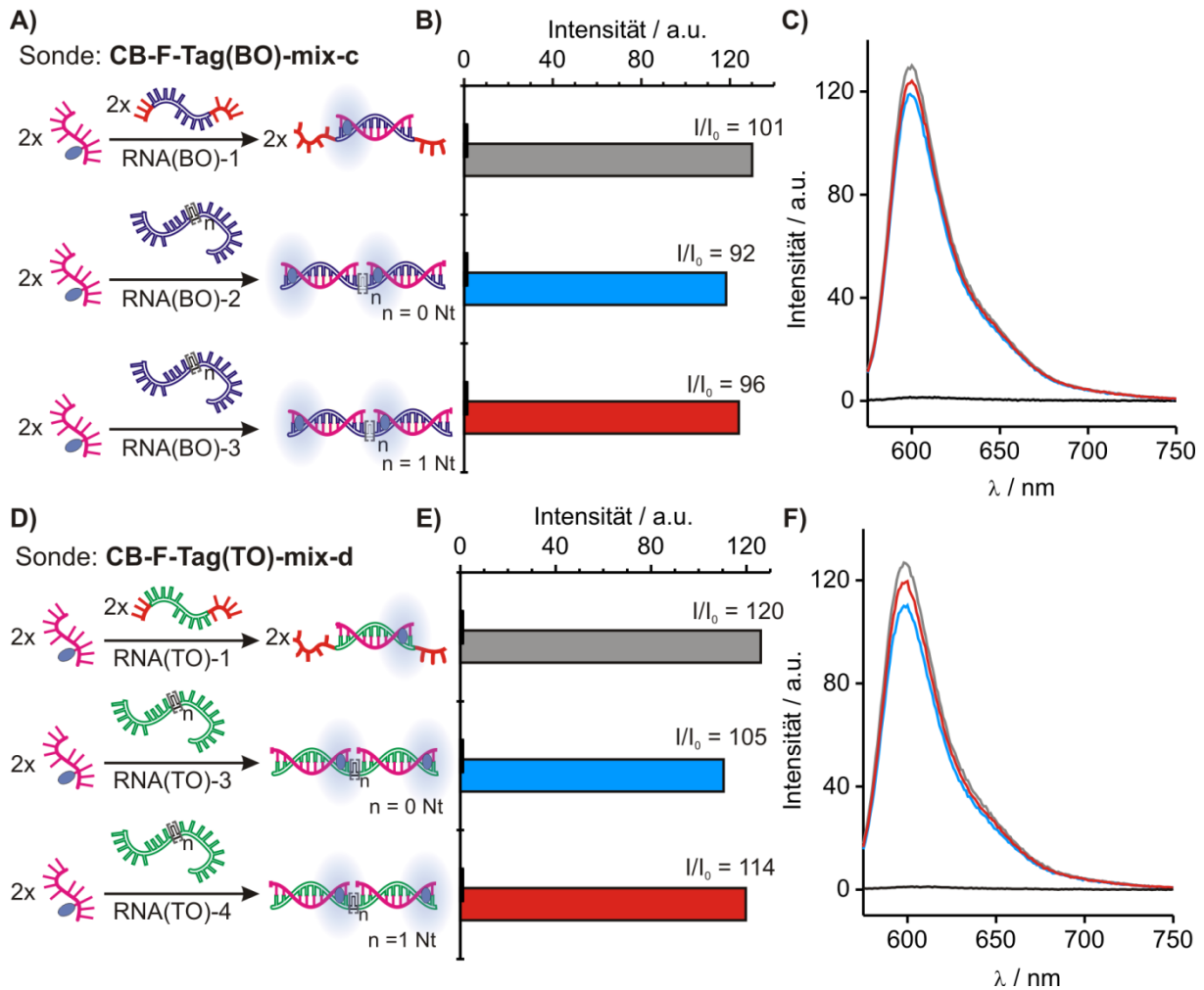


Abbildung 4.8.9: Schematische Darstellung der Hybridisierung (A, D) und Vergleich der Fluoreszenzintensität ($\lambda(\text{em}) = 600 \text{ nm}$) (B, E) sowie der vollständigen Fluoreszenzkurven (C, F) bei Hybridisierung zweier CB-Sonden (wie angegeben) bei 1 bzw. 0 Nukleotiden Abstand gegenüber der Hybridisierung mit konventioneller Ziel-RNA. Die Farbe der Balken und Emissionskurven sind durch die in (A bzw. D) dargestellten Hybridisierungsexperimente gekennzeichnet. Bedingungen: 0.4 nmol Sonde und 0.4 nmol RNA(BO)-1 oder RNA(TO)-1 bzw. 0.2 nmol RNA(BO)-2, RNA(BO)-2, RNA(TO)-3 oder RNA(TO)-4 bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}750 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Zur Überprüfung des Förster-Energietransfers von TO auf CB wurde die direkt benachbarte Hybridisierung von **CB-F-Tag(BO)-mix-c** und **F-Tag(TO)-mix-a** auf der Ziel-RNA **RNA(BOTO)-1** untersucht (Abb. 4.8.10). Die Zugabe der TO-Sonde zu **RNA(BOTO)-1** führte zum 38-fachen Anstieg der TO-Emission, während die darauffolgende Zugabe der CB-Sonde die TO-Emission um 88% verminderte und der Energietransfer dabei einen 80-fachen Fluoreszenzanstieg bei $\lambda(\text{em}) = 600 \text{ nm}$ erbrachte (Experiment I, Abb. 4.8.10A).

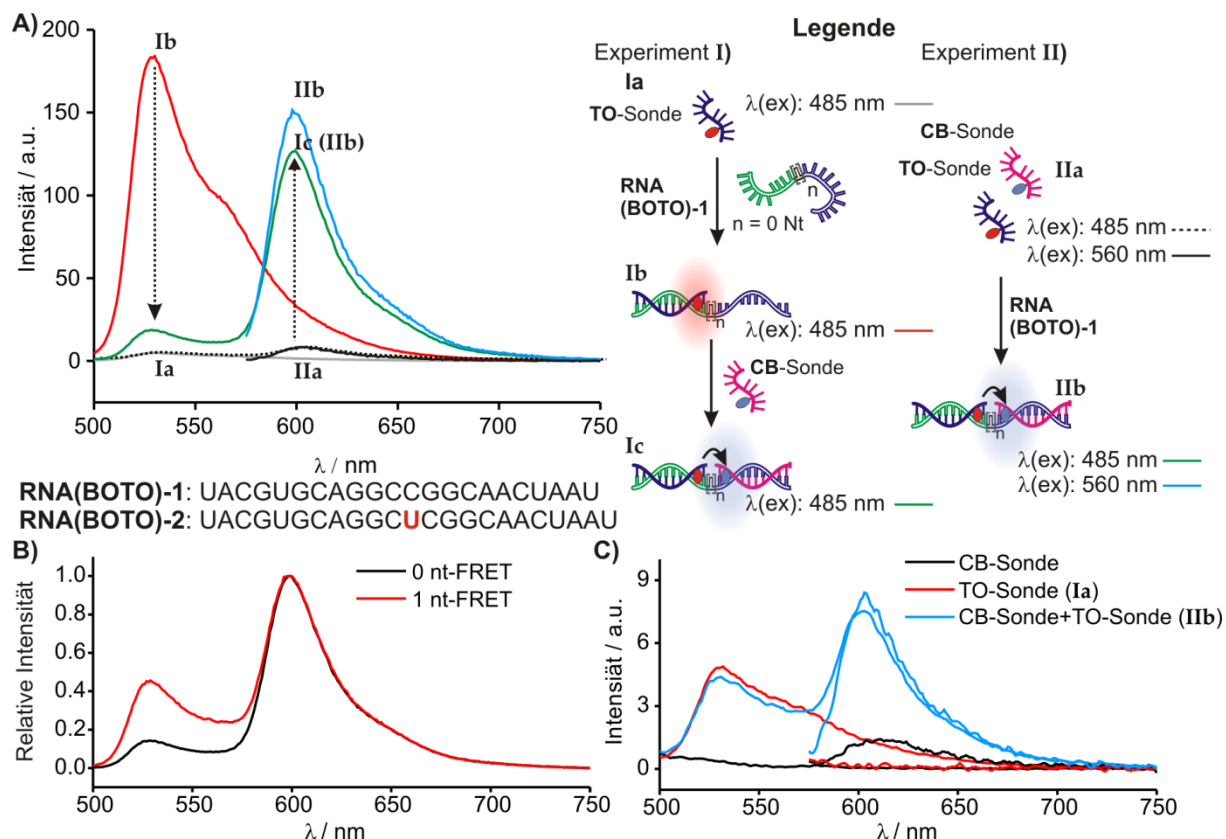


Abbildung 4.8.10: A) Fluoreszenzemissionsspektren bei der Hybridisierung von **F-Tag(TO)-mix-a** sowie **CB-F-Tag(BO)-mix-c** mit **RNA(BOTO)-1**. Die Legende (rechts) zeigt die durchgeführten Experimente zur konsekutiven Hybridisierung der Sonden (Experiment I) sowie die simultane Hybridisierung beider Sonden (Experiment II). Die Farbmarkierungen entsprechen den jeweiligen Emissionskurven unter Anregung bei der angegebenen Wellenlänge. B) Vergleich des FRET-Signals bei direkt benachbarter Hybridisierung sowie einem Nukleotid Abstand. C) Vergleich der Emission der einzelnen Sonden sowie der Mischung beider Sonden im Einzelstrang. Bedingungen: 400 nM je Sonde bzw. **RNA(BOTO)-1**, bei Zugabe, in PBS; TO und FRET: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}750 \text{ nm}$, CB: $\lambda(\text{ex}) = 56 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}750 \text{ nm}$ slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Wurden beide Sonden vorgelegt und mit **RNA(BOTO)-1** hybridisiert (Experiment II, Abb. 4.8.10A), so erschien die Fluoreszenzintensivierung des FRET-Signals verringert ($I/I_0 = 17$). Der Grund dafür liegt erneut in der leicht vergrößerten Hintergrundfluoreszenz. In Abwesenheit von Ziel-RNA wurde bei der Anregungswellenlänge ($\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$) eine schwache CB-Emission beobachtet, während die CB-Sonde alleine eine sehr geringe Fluoreszenzemission zeigte (Abb. 4.8.10C). Somit wurde ebenfalls die Responsivität des CB-Kanals auf $I/I_0 = 20$ verringert. Erneut erwiesen sich der vergrößerte Abstand und ein ungepaartes Nukleotid (**RNA(BOTO)-2**) als deutlich weniger geeignet für einen effizienten Energietransfer (Abb. 4.8.10B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle drei Farbkanäle auch bei benachbarter Hybridisierung, trotz einer geringen Selbstlöschung starke Fluoreszenzanstiege erzielen. Ebenfalls der Energietransfer von BO zu TO sowie von TO zu CB konnte mit einer Effizienz von 91% bzw. 88% starke Fluoreszenzintensivierungen liefern (25-fach bzw. 17-fach). Zusammen mit der geringen spektralen Überlappung der drei Chromophore (vgl. Kapitel 4.6.5) stellen diese Ergebnisse eine vielversprechende Grundlage für die zelluläre Anwendung der Fünffarbdetektion dar.

4.8.7 Biochemische Klonierung der Wiederholungssequenzen

Nachdem hervorragende BO- und TO-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden erhalten und deren Positionierung zur benachbarten Hybridisierung überprüft wurden, sollten im nächsten Schritt die Wiederholungseinheiten der Zielsequenzen dargestellt werden. Eine große Anzahl von Wiederholungseinheiten kann in der Regel nicht durch eine lineare DNA-Synthese erfolgen, sondern musste durch Fragmentkondensation erfolgen. Um die Wiederholungssequenzen mittels biochemischer Methoden zu verknüpfen, müssen diese mittels Restriktionsenzymen prozessierbar sein sowie zur Amplifizierung in ein Plasmid eingebracht werden. Ähnliche Arbeitstechniken können in einem nachgeschalteten Schritt dazu benutzt werden, die Wiederholungseinheiten mit einer Ziel-RNA zu verknüpfen und diese transgen in Zellen zu exprimieren. Die Arbeiten zur Klonierung der Wiederholungssequenzen sowie erste Mikroskopie-Experimente konnten dankenswerterweise in eigenständiger Arbeit unter Anleitung von Dr. Alexander Löwer und seinen Mitarbeitern in den Laboren des MDC Berlin-Buch durchgeführt werden.

Als Ausgangspunkt für alle Wiederholungseinheiten wurden 51-53mer DNA-Oligonukleotide verwendet, welche zwei Wiederholungseinheiten der BOTO-FRET- bzw. vier Wiederholungseinheiten der TO- bzw. BO-Sequenz enthielten (siehe Abb.4.8.11 sowie Kapitel 6.9). Die Oligonukleotide waren mit 5'-Überhängen (*sticky ends*) ausgestattet, welche die Ligation mehrerer solcher Sequenzen miteinander ermöglichten. Im Folgenden wird exemplarisch die Darstellung der BOTO-FRET-Wiederholungseinheiten beschrieben, mit den übrigen Zielsequenzen wurde in ähnlicher Weise verfahren. Zunächst wurden die Einzelstränge durch das Enzym *PNK* (*Polynukleotid Kinase*) in Anwesenheit von ATP phosphoryliert und mit der komplementären Sequenz hybridisiert (Abb. 4.8.10A). Die Verknüpfung mehrerer Doppelstränge erfolgte durch *T4-Ligase* in Anwesenheit der Restriktionsenzyme *Bam*HI (**G[^]GATCC**) und *Bgl*II (**A[^]GATCT**). Dies war notwendig, um lediglich Kopf-Schwanz-verknüpfte Oligomere zu erhalten. Diese Kombination der *sticky ends* ergab keine Enzymschnittstelle (nicht spaltbar: **GGATCT**), während die Kopf-Kopf bzw. Schwanz-Schwanz Verknüpfung eine Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI bzw. *Bgl*II bildeten und somit wieder gespalten wurden und anschließend erneut ligiert werden können.^[260]

Der Ligationsansatz wurde auf einem Agarose-Gel getrennt, sodass eine definierte Auftrennung unterschiedlich langer Oligomerisierungsprodukte erhalten wurde (Abb. 4.8.10B). Ausgewählte Produktbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und

durch *T4-Ligase* in den Donor-Vektor (**pDO55**) eingefügt, welcher zusätzlich zur MCS (*Multiple Cloning Site*) eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum *Kanamycin* trägt.

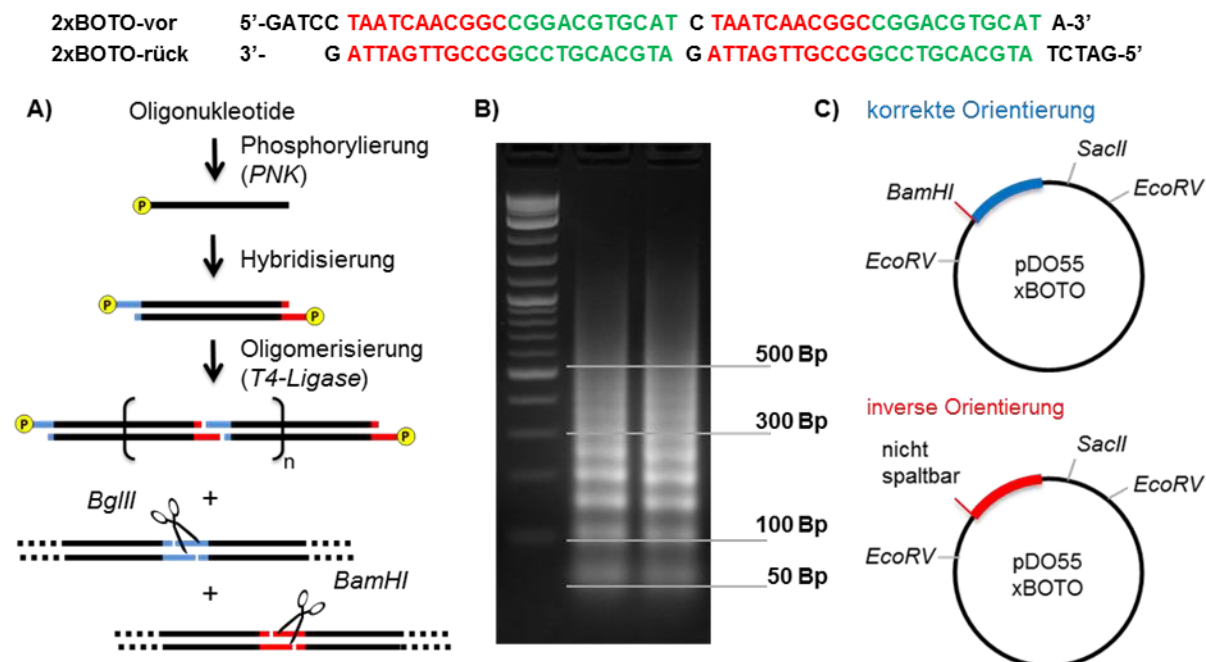


Abbildung 4.8.11: A) Schematische Darstellung der Oligomerisierungsstrategie; B) exemplarische Gel-Analyse der Oligomerisierung und C) schematische Darstellung der Restriktions-Schnittstellen zur Überprüfung der Länge und Orientierung der Wiederholungssequenzen.

Nach der Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen (*New England Biolabs 10-beta*, *E. coli*) und unter Kanamycin-Selektionsdruck sollte in der anschließenden Bakterienkultur lediglich Plasmid-tragende Bakterien überleben. Die Bevölkerungsdichte der Kulturplatten ist dabei ein Maß für die erfolgreiche Transfektion des Plasmids, nicht jedoch für eine bestimmte Länge der Wiederholungssequenzen. Zur Überprüfung der Länge und der korrekten Orientierung der Wiederholungseinheiten wurden einige Kolonien ausgewählt (24 Stück), in Inkubationsröhrchen kultiviert und anschließend die Plasmid-DNA isoliert. Die Analyse der eingefügten Wiederholungssequenzen erfolgte durch Verdau mit Restriktionsenzymen *XbaI* (T[^]CTAGA) oder *EcoRV* (GAT[^]ATC) und der anschließenden Trennung mittels eines Agarosegels, wobei der erfolgreiche Einbau und die Längen der Wiederholungseinheiten durch die Größe der erhaltenen Gel-Banden ermittelt wurde. Für positive Plasmide wurde zusätzlich die korrekte Orientierung der Wiederholungssequenz durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SacII* (CCGC[^]GG) überprüft (siehe Abb. 4.8.10C), wobei die korrekte Orientierung eine Gelbande der entsprechenden Größe ergab. Die inverse Orientierung besitzt hingegen keine *BamHI*-Schnittstelle, sodass lediglich das linearisierte Plasmid beobachtet wurde. Zur finalen Analyse und Bestätigung der korrekten Sequenzen wurden die Plasmide der DNA-Sequenzierung unterzogen.

In den meisten Fällen wurden überraschenderweise leere Plasmide gefunden, die keine Wiederholungssequenzen trugen. Darüber hinaus wurde stets der Einbau deutlich kleinerer Fragmente festgestellt als die ausgeschnittene Bande des Gels nach der Oligomerisierung vermuten ließ. Nach mehrfacher Wiederholung der Experimente und zahlreichen

Optimierungsversuchen konnte als bestes Ergebnis lediglich der Einbau von viereinhalb BOTO-Sequenzwiederholungen (entspricht 9xBOTO) festgestellt werden. Das Fehlen der 10ten-Wiederholungseinheit während der Replikation der Bakterien sowie die häufige Detektion von Einzelbasendeletionen während der Sequenzierung belegten die Schwierigkeit der Klonierung von Wiederholungssequenzen.

Deletionsmechanismen und das Überspringen von Wiederholungseinheiten wurden ebenfalls in anderen Arbeiten als Limitierung der Darstellung von Wiederholungssequenzen beschrieben.^[261] Da die 9xBOTO-Wiederholung – abgesehen vom Fehlen der vollständigen zehnten 22mer BOTO-Sequenz – keine weiteren Fehler und die mit Abstand größte Anzahl von Wiederholungseinheiten aufwies, wurde sie als Grundlage für eine alternative Vervielfältigungsstrategie verwendet (Abb. 4.8.12).

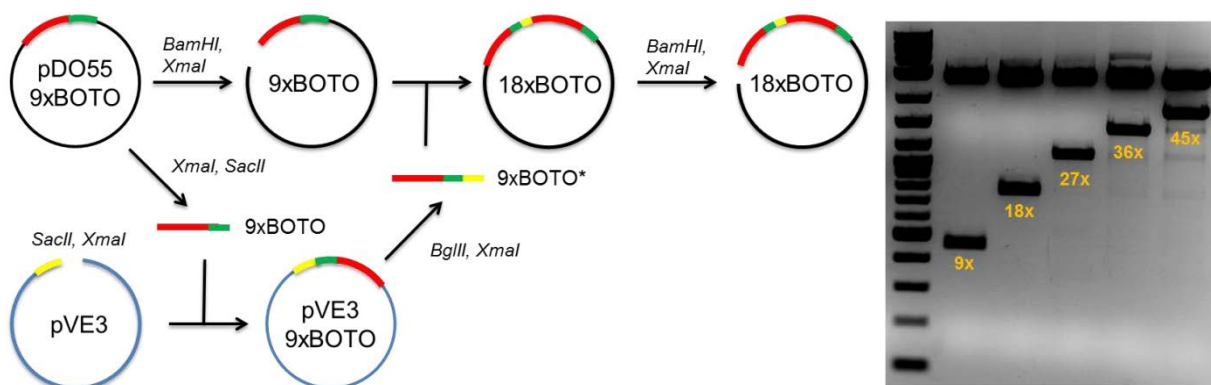


Abbildung 4.8.12: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für eine größere Anzahl an Wiederholungssequenzen sowie deren Gelanalyse.

Das Plasmid **pDO55-9xBOTO** wurde durch die Restriktionsenzyme *Xma*I und *Sac*II verdaut, das Fragment per Agarosegel gereinigt und mit dem Vektor **pVE3** ligiert, welcher zuvor mit denselben Enzymen behandelt wurde. Nach der Amplifizierung, Isolierung und Reinigung von **pVE3-9xBOTO** wurde die Wiederholungssequenz erneut per DNA-Sequenzierung validiert und das 9xBOTO-tragende Fragment mittels Restriktion durch *Bgl*II und *Xma*I verdaut, gereinigt und isoliert. Anschließend wurde das intakte Plasmid **pDO55-9xBOTO** mittels *Bam*HI und *Xma*I (C[^]CCGGG) geschnitten, wodurch die vorhandenen Wiederholungseinheiten erhalten blieben und das *Bgl*II/*Xma*I-9xBOTO-Fragment aus **pVE3** durch Ligation eingefügt werden konnte. Somit konnte, unter Erhalt der terminalen *Bam*HI und *Xma*I-Schnittstellen und der Ausbildung der nicht-spaltbaren *Bam*HI-*Bgl*II-Kombination, die Anzahl der BOTO-Einheiten von 9 auf 18 (**pDO55-18xBOTO**) verdoppelt werden. Das Ligationsprodukt wurde erneut in Zellen transformiert und amplifiziert, sodass die Plasmid-DNA isoliert und per Restriktion und DNA-Sequenzierung charakterisiert werden konnte. Nach dieser Strategie gelang das sukzessive Einfügen von weiteren 9xBOTO-Fragmenten, sodass bis zu 45 fehlerfreie BOTO-Wiederholungen erzielt wurden. Die Darstellung größerer Wiederholungseinheiten wurde an dieser Stelle nicht untersucht.

In ähnlicher Weise wurden Plasmide mit 12, 24 und 36 TO-Wiederholungseinheiten dargestellt. Weitergehende Arbeiten wurden von bzw. in Zusammenarbeit mit M. Sc. Dhana Friedrich (Arbeitsgruppe Löwer, MDC) durchgeführt. So konnten ebenfalls 12, 24 und 35 BO-

Wiederholungseinheiten dargestellt werden. Auch nach zahlreichen Versuchen gelang es nicht 36 intakte Wiederholungseinheiten zu erhalten, da stets Fehler in der letzten 11mer-Sequenz beobachtet wurden.

Die Kombination von 45xBOTO, 36xTO sowie 35xBO sollte vergleichbare Helligkeiten erzielen, da die geringere absolute Intensität des BOTO-FRET durch eine größere Anzahl an Wiederholungen ausgeglichen werden sollte. Bei Bedarf könnte durch alternative Restriktionsenzyme die Anzahl der Wiederholungseinheiten verdoppelt werden – von dieser Möglichkeit wurde zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit jedoch abgesehen.

4.8.8 Messung von *in vitro*-transkribierter RNA

Um sicherzustellen, dass die vollständigen Wiederholungseinheiten exprimiert und durch die Sonden gebunden werden, wurden die Plasmide durch *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben und vervielfältigt. Dabei dient das linearisierte Plasmid bzw. ein ausgeschnittenes Fragment als Templat für die Transkription mittels T7-Polymerase. Die entsprechenden T7-Promotor-Sequenzen waren auf dem Donorvektor (**pDO55**) bereits vorhanden. Die erhaltene RNA-Menge war ausreichend um konventionelle Experimente am Fluoreszenzspektrometer durchführen zu können. Somit bietet die *in vitro*-Transkription eine sehr einfache Möglichkeit die unterschiedlichen Längen der Wiederholungssequenzen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität zu vergleichen. Die Transkripte wurden mit Hilfe eines *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kits* (New England Biolabs Inc.) nach Herstellerangabe angefertigt und ihre Konzentration bestimmt. Laut dieser Abschätzung wurde dieselbe Stoffmenge (10 pmol) der jeweiligen RNA vorgelegt, sodass der Länge des Tags entsprechend 120, 240 bzw. 360 (350) pmol der jeweiligen Sonde hybridisieren können. Bei stetiger Zugabe von Sonde sollten die kürzeren *Tags* schneller die Sättigung des Fluoreszenzsignals erreichen. Für TO wurde die Fluoreszenz der drei unterschiedlich langen Wiederholungseinheiten, sowie die des Einzelstrangs (nur Puffer) bei schrittweiser Zugabe der Sonde **F-Tag(TO)-mix-a** überprüft (Abb. 4.8.13). Es war deutlich zu erkennen, dass die Anwesenheit der RNA zu Fluoreszenzanstiegen führte, jedoch waren die Responsivitäten im Vergleich zu den vorherigen *in vitro*-Experimenten verringert ($I/I_0 \approx 16$). Für die kürzeren Ziel-RNAs wurde die Sättigung früher erreicht als für die längeren. Dieser Trend ist zwar konsistent mit der zunehmenden Länge der Wiederholungseinheiten, allerdings konnten keine quantitative Aussage über die Intensitätsverhältnisse getroffen werden, weil die Sättigung des Signals in allen Fällen später auftrat, als es die vorgelegte Menge der *in vitro*-transkribierten RNA erwarten ließ. So wurde die Sättigung von 10 pmol der 12xTO-Wiederholungseinheit erst bei ca. 180 pmol TO-Sonde erzielt, von 24xTO bei ca. 300 pmol und bei 36xTO bei ca. 500 pmol Sonde.

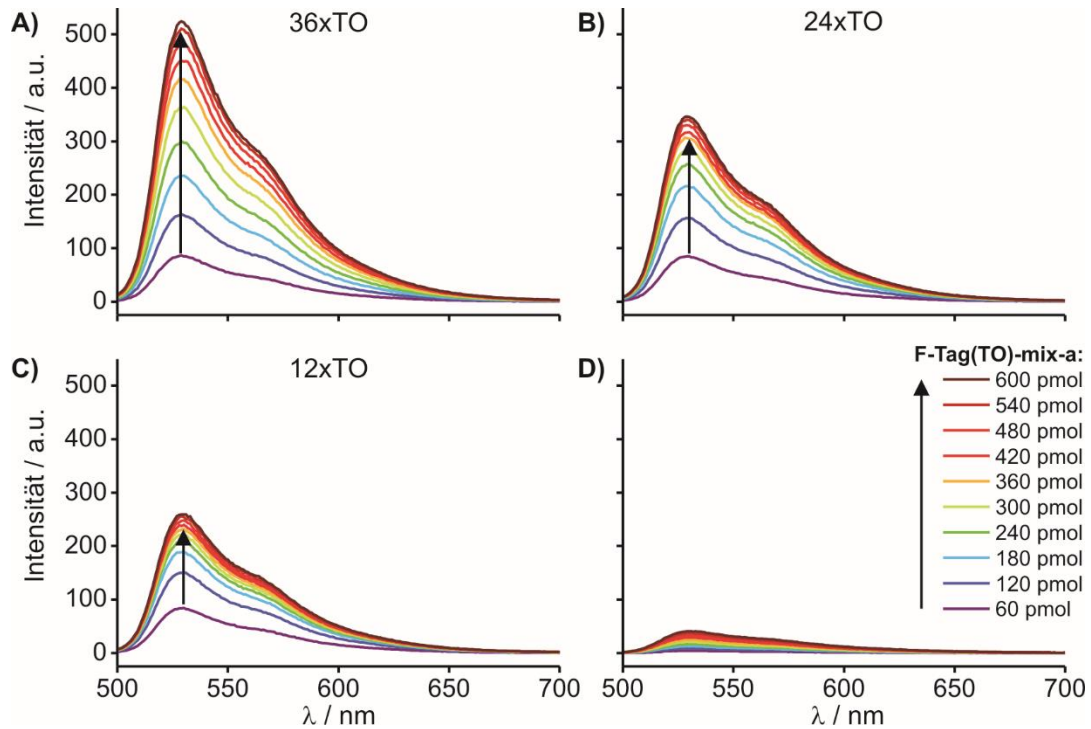


Abbildung 4.8.13: Titration von Sonde **F-Tag(TO)-mix-a** zu jeweils 10 pmol des *in vitro*-Transkripts von A) pDO55x36TO; B) pDO55x24TO; C) pDO55x12TO; D) Puffer. Bedingungen: Endvolumen = 1 mL in Puffer (40 mM TRIS, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5), $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 25 °C.

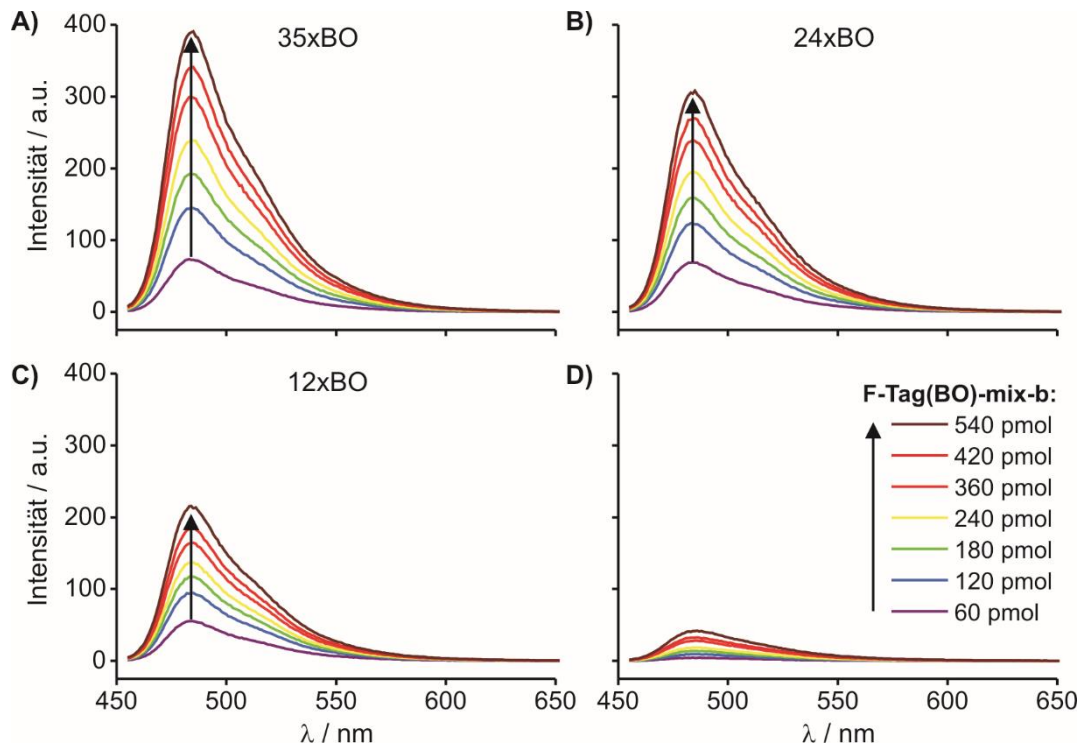


Abbildung 4.8.14: Titration von Sonde **F-Tag(BO)-mix-b** zu jeweils 10 pmol des *in vitro*-Transkripts von A) pDO55x35BO; B) pDO55x24BO; C) pDO55x12BO; D) Puffer. Bedingungen: Endvolumen = 1 mL in Puffer (40 mM TRIS, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5), $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}650 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 25 °C.

Die verringerte Responsivität und das späte Erreichen der Sättigung legen die Vermutung nahe, dass die Sonden nicht quantitativ mit den Ziel-RNAs hybridisieren. Mögliche Ursachen könnten zum einen die verringerte RNA-Konzentration (10 nM gegenüber 0.5 μM) und die damit einhergehende verminderte Stabilität der Sonde-Target-Komplexe sein. Ebenfalls

könnten die langen RNAs eine Sekundärstruktur einnehmen, welche erst bei zunehmender Hybridisierung durch Sondenmoleküle vollständig aufgebrochen wurde.

Die Untersuchung der BO-Wiederholungseinheiten (Abb. 4.8.14) zeigte ebenfalls verringerte Responsivitäten und eine sehr langsame Gleichgewichtseinstellung der Hybridisierung, weshalb in diesen Experimenten keine Sättigung des Signals erreicht wurde. Auch in diesem Fall war anzunehmen, dass die Ziel-RNA eine Sekundärstruktur ausbildet.

Dennoch ist in diesen Experimenten die unterschiedliche Fluoreszenzintensität bei Verwendung unterschiedlich langer Wiederholungseinheiten deutlich zu erkennen. Für die Anwendung in Zellen ist demnach anzunehmen, dass die Wiederholungseinheiten zwar große Fluoreszenzintensitäten liefern, jedoch die vollständige Hybridisierung der Sonden gründlich und ggf. zeitabhängig untersucht werden muss.

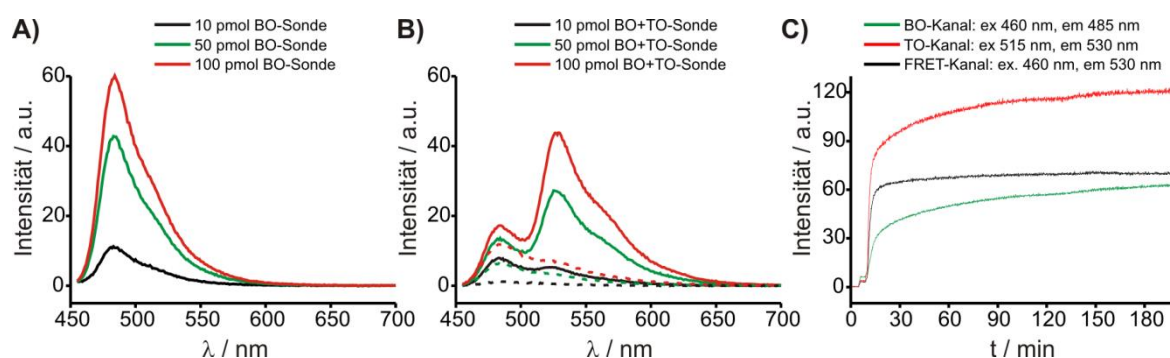


Abbildung 4.8.15: Untersuchungen der *in vitro*-transkribierten BOTO-Wiederholungssequenz bei A) Zugabe der BO-Sonde zu 80 pmol der *in vitro*-transkribierten BOTO-RNA; B) Vergleich der Emission von BO- und TO-Sonde vor (gestrichelt) und nach Zugabe (durchgehend) von ca. 80 pmol der *in vitro*-transkribierten RNA. C) Zeitabhängige Fluoreszenz zur Echtzeitverfolgung der *in vitro*-Transkription bei Anwesenheit von BO- und TO-Sonden. Bedingungen: A+B: Endvolumen = 1 mL in Puffer (40 mM TRIS, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5), $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{-}700 \text{ nm}$; C: siehe Abbildung; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Für die BOTO-FRET-Wiederholungssequenz wurde die *in vitro*-transkribierte RNA des 45xBOTO-Plasmids untersucht. Erneut wurde Ziel-RNA (ca. 80 pmol) vorgelegt und die BO-Sonde (Abb. 4.8.15A) bzw. beide Sonden hinzutitriert (Abb. 4.8.15B) und mit dem Hintergrundsignal (Sonde in Puffer) verglichen. Bei Zugabe der BO-Sonde wurde allein der Anstieg des BO-Signals registriert, während bei Zugabe beider Sonden in geringer Konzentration nur ein geringer Energietransfer von BO zu TO registriert wurde (schwarze Linien Abb. 4.8.15B). Erst die zunehmende Absättigung der RNA und die daraus resultierende benachbarte Hybridisierung von BO und TO führte zu einem starken FRET-Signal (grüne und rote Linien, Abb. 4.8.15B). Zusätzlich wurde in Anwesenheit des linearisierten Plasmids **pDO55x45BOTO** und beider Sonden die *in vitro*-Transkription durchgeführt und das Fluoreszenzsignal über einen Zeitraum von drei Stunden verfolgt (Abb. 4.8.15C). In diesem Experiment wurde deutlich, dass unmittelbar nach Start der Reaktion ein effizienter Energietransfer ($\lambda(\text{ex}) = 460 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 530 \text{ nm}$) erfolgt. Bei fortschreitender Reaktion (> 30 min) bleibt das FRET-Signal konstant, während die Fluoreszenz des TO-Kanals ($\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 530 \text{ nm}$) und des BO-Kanals ($\lambda(\text{ex}) = 460 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$) geringfügig steigt. Der große Überschuss an Sonden zu Beginn der *in vitro*-Transkription sättigte die entstehende RNA nahezu vollständig durch die benachbarte Hybridisierung von BO- und TO-Sonden ab.

Die weitere Produktion von RNA und die Verringerung der Konzentration an freier Sonde führten zu einer statistischen Verteilung der BO- und TO-Sonden bei der weiteren Hybridisierung. Somit stieg lediglich die Intensität der TO- und BO-Emission, nicht jedoch die Intensität der FRET-Emission. Diese Experimente verdeutlichen die Schwierigkeiten bei der benachbarten Hybridisierung verschiedener Sonden. Für einen effizienten Energietransfer ist es zwingend erforderlich, dass die Konzentration der Sonde oberhalb der Konzentration an Hybridisierungsstellen liegt, da andernfalls eine statistische Verteilung der Sonden erfolgen kann, was die Effizienz des Energietransfers reduziert.

4.8.9 Generierung stabiler Zelllinien zur Expression des F-Tags

Um die Anwendung des F-Tag-Konzepts in Zellen zu untersuchen, wurden aus den hergestellten Wiederholungssequenzen Expressionsplasmide hergestellt. Diese bestehen im Wesentlichen aus drei Elementen: 1) einem schaltbaren Promotor, 2) einer zu untersuchenden RNA sowie 3) den F-Tag-Wiederholungseinheiten.

Der Tetrazyklin-abhängige Promotor ermöglicht die Expressionsregulation der transgenen RNA und ist als Schalter zu verstehen (Tet-on-System). In Anwesenheit von Doxycyclin (einem Tetrazyklin-Antibiotikum) wird die RNA inklusive den Wiederholungseinheiten exprimiert, in Abwesenheit jedoch nicht. Als zu untersuchende RNA wurde die mRNA für ein fluoreszentes Protein (FP) gewählt. Dies ermöglicht die einfache Überprüfung der Expression der transgenen RNA durch die Detektion des Fluoreszenzproteins. Da neben dem FP gleichzeitig die Fluoreszenz der Sonden ausgelesen werden sollte, wurden die FPs so gewählt, dass keine spektrale Überlappung der Fluorophore besteht. Für TO wurde das NIR-FP (Nah-Infra-Rot FP), für BO und BOTO-FRET wurde mCherry ausgewählt. Die Generierung der Expressionsplasmide erfolgte durch das *Gateway-Cloning®-System* mit einem *LR-Klonase-Kit* (Invitrogen) nach Herstellerangaben (siehe Abb. 4.8.16). Dazu wurden Donor-Vektoren für den Promotor sowie das spezifische FP und das F-Tag in einen Ziel-Vektor eingefügt, in Bakterien transformiert und die Plasmidsequenz durch restriktionsenzymatischen Verdau analysiert.

Die erhaltenen Plasmide konnten ebenfalls nach literaturbekannter Methoden unter Verwendung der sogenannten *Flp-In-Systems* (Invitrogen, Carlsbad, USA) in HEK-Zellen (*Flp-In™ 293 T-REx™*) eingebracht und durch Antibiotika selektiert werden.^[262]

Während nach vier Stunden bereits ein schwaches Fluoreszenzsignal zu beobachten war, wurde nach ca. 12 h ein konstantes Signal erreicht, wodurch die korrekte Expression des FP bestätigt wurde. Diese Zeitverzögerung ergibt sich durch die relativ schnell ablaufende Transkription und Translation, während hingegen die Faltung des Fluoreszenzproteins sowie die Ausbildung des intakten Chromophors mehrere Stunden benötigt.

4.8. F-Tag – Wiederholungssequenzen zur Mehrfarbdetektion transgener RNAs mittels FIT-Sonden

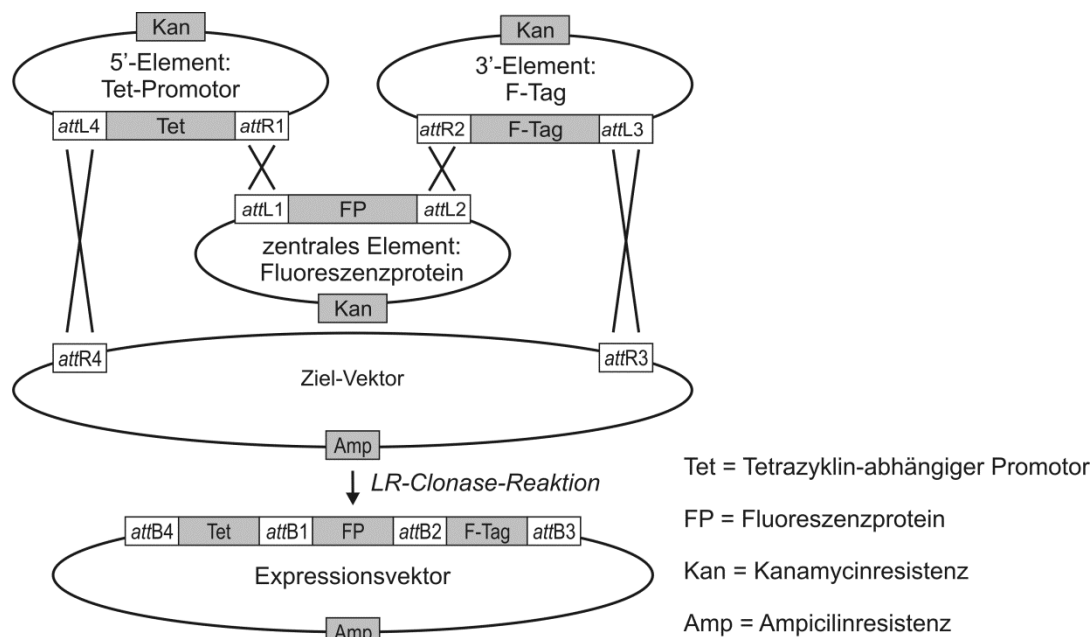


Abbildung 4.8.16: Schematische Darstellung der LR-Reaktion zur Kombination mehrerer Plasmide.

Zur Überprüfung der stabilen Zelllinien wurde zunächst allein die Expression des Fluoreszenzproteins untersucht. Dazu wurden lebende, mCherry-45xBOTO-exprimierende Zellen in farblosem RPMI-Medium in Mikrotiterplatten mit Glasboden überführt, über Nacht zur Adhäsion inkubiert und unmittelbar vor dem Mikroskopieexperiment mit Doxycyclin (2 µg/mL) versetzt. Die Induktion der FP-Fluoreszenz auf dem mCherry-Kanal wurde über den Zeitraum von 20 h in einem Intervall von 4 h aufgezeichnet (Abb. 4.8.17).

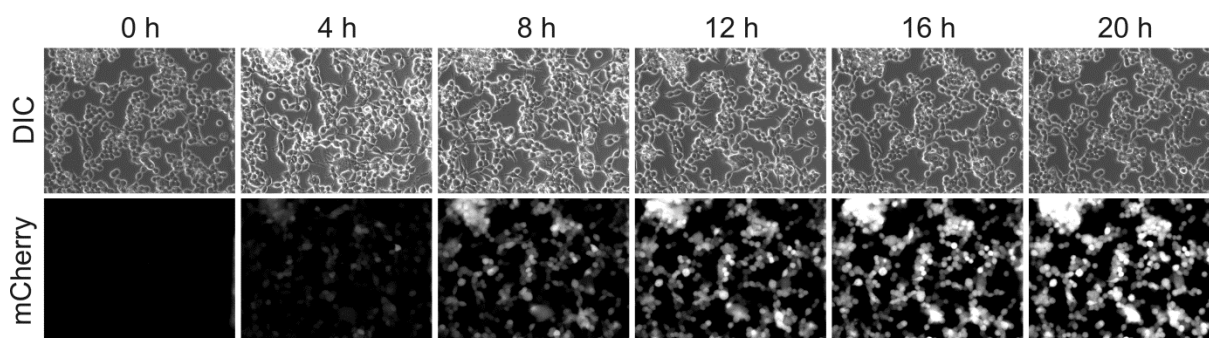


Abbildung 4.8.17: Weitfeld-Mikroskopie der mCherry-45xBOTO-Expression von HEK-Flp-In-Zellen. Durchlicht (DIC = Differentialinterferenzkontrast) und mCherry-Fluoreszenzkanal in 20-facher Vergrößerung und Zeitabhängigkeit nach der Zugabe von Doxycyclin.

Im nachfolgenden Schritt sollte überprüft werden, ob die Zellen nicht nur das FP, sondern ebenfalls die Wiederholungseinheiten zur Hybridisierung der FIT-Sonden transkribieren. Dazu wurde analog zu den Experimenten in Kapitel 4.3 und 4.5 das waschfreie FISH-Protokoll verwendet. Die IRFP-36xTO-Zellen wurden 1 h mit Doxycyclin behandelt, wodurch die Transkription der IRFP-36x-TO-RNA initiiert wurde und anschließend in *p*-Formaldehyd fixiert und mit 200 nM TO-Sonde inkubiert (Abb. 4.8.18A-C). Zur Kontrolle wurden ebenfalls nicht-Doxycyclin-induzierte Zellen überprüft (Abb. 4.8.18D-F).

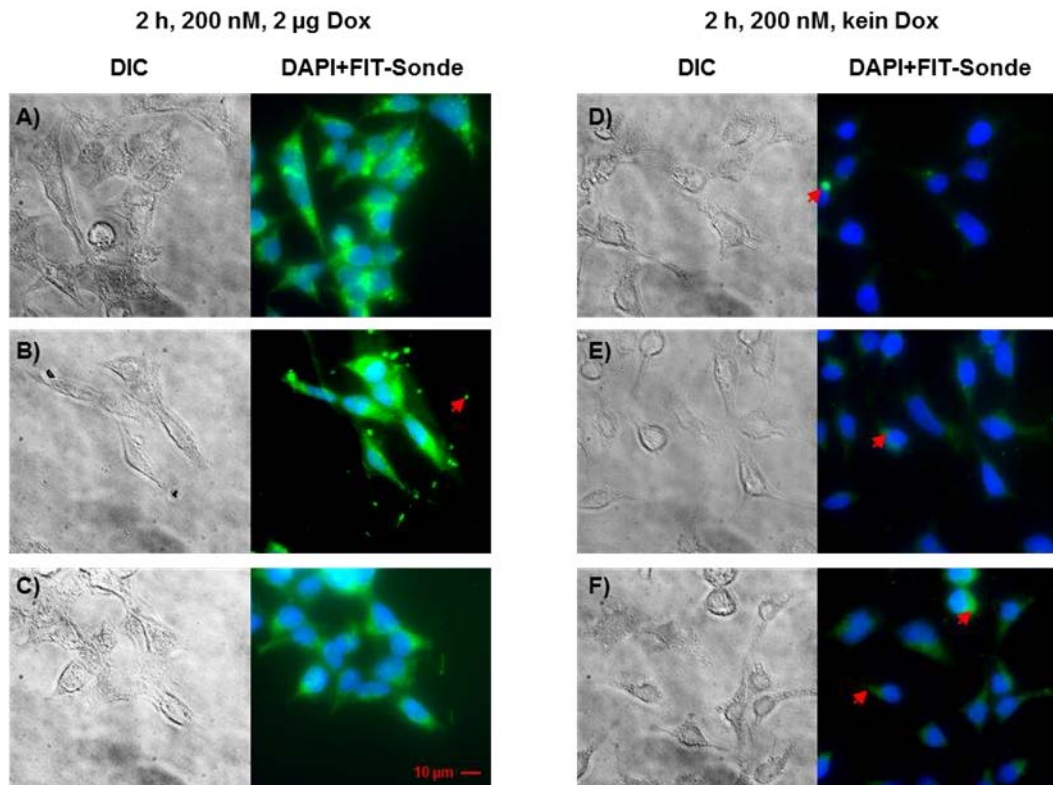


Abbildung 4.8.18: Weitefeldmikroskopie der Doxycyclin-induzierten (A-C) und nicht-induzierten (D-F) IRFP-36xTO-HEK-Zellen bei Aufnahme des DIC-Kanals (Durchlicht) sowie der Überlagerung von DAPI (Kernmarker, blau, CFP-Filter) und TO-Signal (grün, GFP-Filter). Die roten Pfeile markieren exemplarisch das vergrößerte Hintergrundsignal auf dem TO-Kanal.

Bei identischen Mikroskopeinstellungen und Belichtungszeiten war deutlich das spezifische TO-Signal (grün in Abb. 4.8.18) bei Stimulation des Promotors zu sehen. Hingegen wurde bei Abwesenheit von Doxycyclin nur geringe Signalintensitäten verzeichnet. Teilweise wurde jedoch ein Hintergrundsignal beobachtet (rote Pfeile in Abb. 4.8.18), welches vermutlich ungebundener Sonde sowie zellulärer Autofluoreszenz zuzuordnen ist. Auch wenn diese ersten Untersuchungen keine quantitativen Aussagen zulassen, ist ein deutlicher Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen erkennbar, wodurch die Expression des F-Tags bestätigt werden konnte. Da die Verwendung von Wiederholungseinheiten vor allem für die Lebendzell-Bildgebung von Interesse ist, wurde eine Optimierung der *FISH*-Experimente nicht vorgenommen. Aktuelle Arbeiten von Ms. C. Dhana Friedrich beschäftigen sich mit der Anwendung des F-Tags in lebenden Zellen.

4.8.10 Diskussion

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich FIT-Sonden zur benachbarten Hybridisierung auf Wiederholungseinheiten (F-Tag) eignen. Die benachbarte Hybridisierung wurde mit den Reportern TO, BO und CB untersucht. Dazu wurden kurze Sonden (11mere) gewählt, welche ein besonders niedriges Fluoreszenzsignal im Einzelstrang liefern und dadurch sehr starke Responsivität aufwiesen. Während der positive Einfluss von LNA bzw. des 1-Nt-Abstand-Designs bereits für TO und CB diskutiert wurde, konnte an dieser Stelle ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Leistungsfähigkeit von BO-markierten

Sonden beobachtet werden. Durch die kurzen Sonden und den Einbau von LNA wurden erstmals deutlich vergrößerte Responsivitäten für BO festgestellt ($I/I_0 > 10$). Dieses Sondendesign sollte auch in zukünftigen Anwendungen die Darstellung effizienter Sonden ermöglichen. Durch den Abstand von einem ungepaarten Nukleotid zwischen den jeweiligen Wiederholungseinheiten wurde eine signifikante Selbst-Löschung mehrerer Chromophore vermieden.

Neben den Fluoreszenzkanälen der jeweiligen Chromophore wurde ebenfalls der Förster-Resonanzenergietransfer von BO zu TO und von TO zu CB durch die benachbarte Hybridisierung der entsprechenden Sonden untersucht. Das Sondendesign erlaubte einen Reporterabstand von sieben Nukleotiden, wodurch eine effiziente Verminderung des Donorsignals (88-91%) sowie ein starker Anstieg des Akzeptorsignals erzielt wurden. Eine Vergrößerung des Abstands und der Flexibilität durch ein ungepaartes Nukleotid zwischen beiden Sonden resultierte in einer deutlich vergrößerten Restemission des Donors.

Zur Anwendung des F-Tags in Zellen wurden Wiederholungseinheiten zur benachbarten Hybridisierung dargestellt und gemeinsam mit einem Promotor sowie einer Sequenz, welche für ein fluoreszentes Protein codiert, durch das *Gateway-Cloning®-System* in HEK-Zellen eingebracht. Diese stabilen Zellenlinien ermöglichten in ersten Untersuchungen die Überprüfung der Expression und der Sonden in fixierten Zellen. Aktuelle Arbeiten zur Anwendung des F-Tags in lebenden Zellen werden von Ms. C. Dhana Friedrich in der Arbeitsgruppe von Dr. Alexander Löwer (MDC Berlin-Buch) durchgeführt.

Wiederholungseinheiten für Hybridisierungssonden wurden bereits für andere Sondenkonzepte beschrieben. Für *ECHO-Probes* generierten Kubota *et al.* zwei orthogonale Wiederholungssequenzen (bis zu 128 Wiederholungen einer 18mer Zielsequenz), welche ebenfalls mit der mRNA codierend für ein fluoreszentes Protein verknüpft waren. Durch transiente Transfektion konnte die Orthogonalität der beiden grün und rot emittierenden Sonden bei Anwesenheit der entsprechenden Wiederholungssequenzen demonstriert werden.^[183] Weitere Untersuchungen, die über die grundsätzliche Funktionalität des Konzepts hinausgehen, wurden bisher nicht beschrieben. Für Molecular Beacons wurden 96 Wiederholungseinheiten beschrieben, welche es erlaubten den Export von mRNA bzw. mRNPs aus dem Zellkern detailliert zu untersuchen.^[151] In weiteren Experimenten konnte u.a. gezeigt werden, dass die große Anzahl an Wiederholungseinheiten die Detektion von einzelnen mRNAs erlaubt. Durch die Kombinierte Verwendung derselben Wiederholungseinheiten konnten Zhang *et al.* RNA Moleküle mittels *Ratiometric Bimolecular Beacons* (RBMBs, siehe Kapitel 2.4.1) quantifizieren.^[152] Bisher ungeklärt bleibt der Einfluss der großen Zunahme des Molekulargewichts durch die Hybridisierung zahlreicher Sonden oder der Rekrutierung mehrerer fluoreszenter Fusionsproteine. Durch das geringe Molekulargewicht der kurzen FIT-Sonden und der möglichen Fünffarbdetektion sollte es möglich sein durch das F-Tag verschiedene transgene RNA einzelmolekülspezifisch nachzuweisen. Gleichzeitig sollte ein detaillierter Vergleich zwischen dem MS2-FP-System und dem F-Tag einen Aufschluss für den Einfluss des zusätzlichen Molekulargewichts liefern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Effiziente Hybridisierungssonden zur Detektion von Nukleinsäuren zeichnen sich durch eine hohe Sequenzspezifität und Sensitivität aus. Die meisten Konzepte basieren auf der effizienten Fluoreszenzlöschung durch Aggregation zweier Reporter im ungebundenen Zustand, z.B. durch einen Fluorophor-Quencher-Komplex. Die Hybridisierung zur Zielsequenz induziert eine globale Konformationsänderung, sodass die Aggregation aufgebrochen wird und die verminderte Fluoreszenzlöschung einen starken Fluoreszenzanstieg bewirkt.

Das in der Arbeitsgruppe Seitz entwickelte Konzept der erzwungenen Interkalation beruht hingegen auf der Substitution einer kanonischen Nukleobase durch ein umgebungssensitives Cyaninchromophor (z.B. Thiazolorange (TO), Abb. 4.5.1).^[185, 263] Im ungebundenen Zustand wird der angeregte Zustand durch Rotation um die zentrale Methinbrücke entvölkert. Die Hybridisierung mit einer komplementären Zielsequenz schränkt diese intramolekulare Rotation ein, wodurch die Quantenausbeute ansteigt. Einzelbasenfehlpaarungen in Nachbarschaft des TO-Reporters resultieren in vermehrten Rotationsfreiheitsgraden und dadurch in einem abgeschwächten Fluoreszenzsignal.^[264] Diese Selektivität ermöglicht die Einzelbasen-spezifische Nukleinsäuredetektion unter nicht-stringenten Bedingungen. PNA-FIT-Sonden konnten erfolgreich in der Lebendzell-Bildgebung^[86, 191-193] und der Einzelbasen-spezifischen PCR eingesetzt werden.^[189] Besonders responsive Sonden wurden durch die Verknüpfung von FIT-PNA mit terminalen Reportern erzielt.

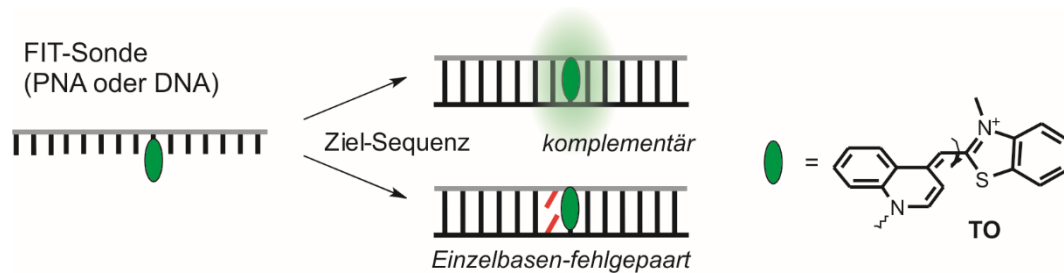


Abbildung 5.1.1: Schematische Darstellung des Konzepts der erzwungenen Interkalation.

Trotz aller Erfolge mit PNA-FIT-Sonden, begrenzt die Löslichkeit der Sonden die Anwendung in biologischen Fragestellungen, z.B. durch unspezifische Bindung oder Aggregation. Zusätzlich besteht für PNA-FIT-Sonden ein großer Anspruch an die optimale Positionierung innerhalb der PNA-Sequenz, um nützliche Sonden zu erhalten. Zusammen mit den vergleichsweise hohen Kosten und der langsamen Kupplungschemie zur Verknüpfung der PNA-Einheiten ist die Anwendbarkeit von PNA-basierten FIT-Sonden limitiert.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, arbeiteten Bethge *et al.* an der Übertragung des FIT-Konzepts auf DNA-basierte Sonden.^[197, 199] Basierend auf diesen Vorarbeiten wurden DNA-FIT-Sonden zu einem leistungsfähigen und vielseitigen Werkzeug in der RNA-Detektion weiterentwickelt.

Ein leistungsfähiges TO-Nukleosidanalogon sollte sich nicht nur durch einen großen Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung, sondern ebenfalls durch die Toleranz von vielen verschiedenen Sequenzumgebungen auszeichnen. Auf einem Sequenzausschnitt der β -Aktin-RNA wurde das azyklische **Ser(TO)** mit den carbozyklischen Nukleosiden α - und β -**cRib(TO)** verglichen (Abb. 5.1.2A-B), wobei **Ser(TO)** die größte Leistungsfähigkeit bewies.^[211] Auch zur Detektion von *Influenza-H1N1-Neuraminidase*-RNA durch das BO-Chromophor bewies Serinol bzw. **Ser(BO)** die größere Leistungsfähigkeit gegenüber der carbozyklischen Anbindung (Abb. 5.1.2C).

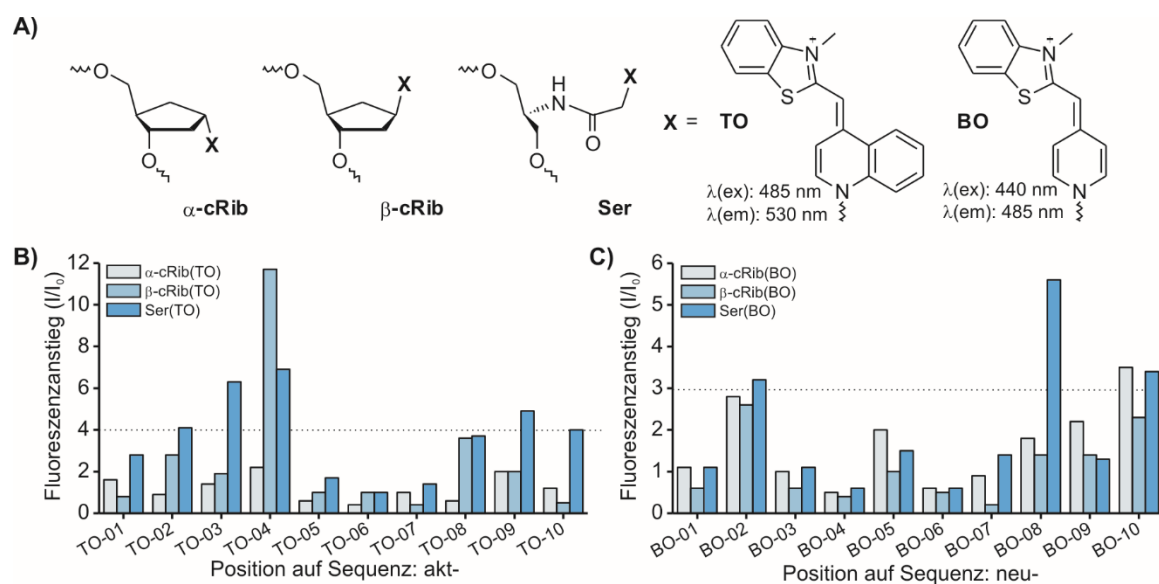


Abbildung 5.1.2: A) Strukturen der Anbindungsmodi und Farbstoffe; B) Fluoreszenzanstieg bei Hybridisierung der Aktin-TO-Sonden und der C) Neuraminidase-BO-Sonden.

Im Gegensatz zu Cyaninfarbstoffen konnte mit diesen *Linker*-Molekülen nicht das zwitterionische 6-Hydroxychinolinium (**6HC**) in DNA eingebaut werden. Die Anbindung des 6HC durch Alkylierung von Glycidol gelang jedoch problemlos und erwies sich als ausreichend stabil in der DNA-Synthese. Dies verdeutlichte, dass unterschiedliche Chromophore durchaus einer unterschiedlichen Verknüpfungsstrategie bedürfen. In Arbeiten der Gruppe von Prof. Ernsting konnte die 6HC-markierte DNA der Absorptionsspektroskopie und der NMR-Strukturanalyse unterzogen werden.

Serinol-Farbstoff-markierte Sonden dienten als Ausgangspunkt für die Anwendungen und Erweiterungen des FIT-Konzepts, welche in der folgenden Übersicht zusammengestellt sind (Abb. 5.1.3). Um nicht nur starke Fluoreszenzanstiege bei der *in vitro*-Detektion synthetischer RNA zu erzielen, sondern ebenfalls die Anwendung der Sonden vor zellulärem, autofluoreszentem Hintergrund zu ermöglichen, war ein zentraler Aspekt dieser Arbeit die Verbesserung der Sondenhelligkeit (das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient). Die mehrfach-interne TO-Markierung führte durch die Aggregation der Reporter im ungebundenen Zustand zu vergrößerten Responsivitäten. Der Extinktionskoeffizient dieser Sonden war entsprechend der Anzahl an Chromophoren vergrößert, jedoch wurde die Quantenausbeute durch die Selbst-Löschung mehrerer TO-

Einheiten verringert, sodass letztendlich keine signifikante Zunahme der Helligkeit erzielt werden konnte (siehe Abb. 5.1.4B).

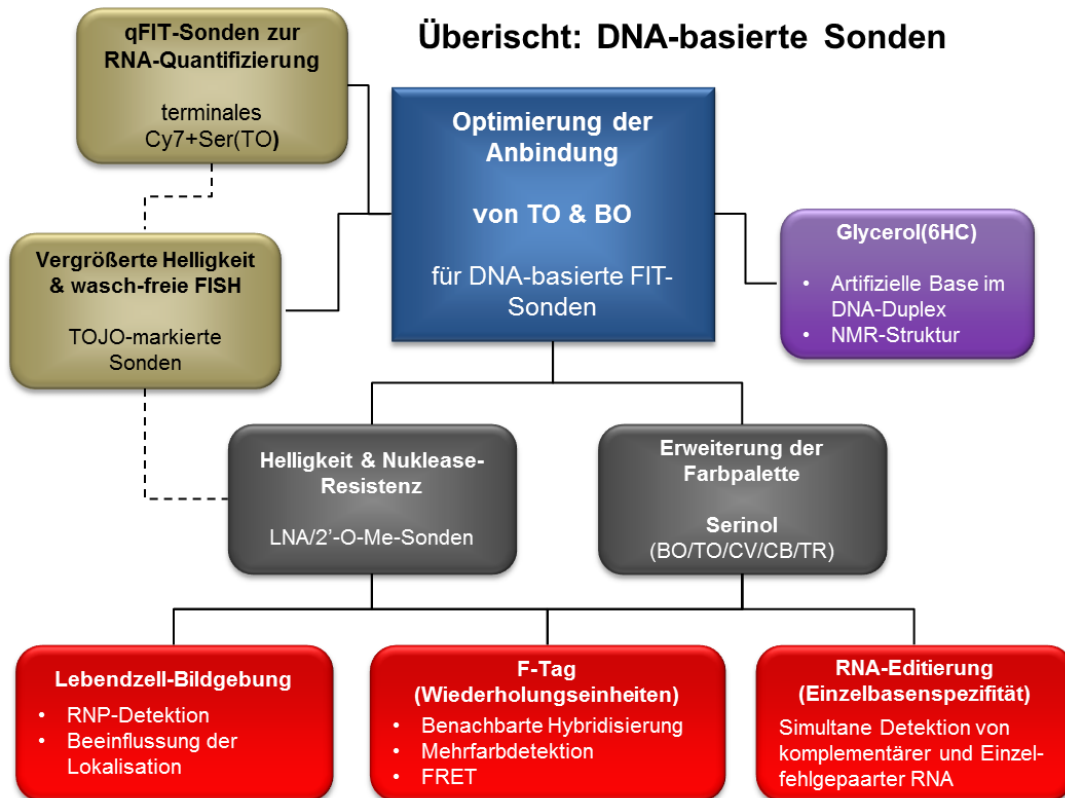


Abbildung 5.1.3: Organigramm der Neuerungen und Entwicklungen innerhalb der Arbeiten zur Promotion.

Die Kombination des responsiven **Ser(TO)** mit dem hellen **Ser(JO)** führte hingegen zu deutlich vergrößerten Helligkeiten (bis zu 500%). Durch die geringe Rotverschiebung von ca. 11 nm des JO gegenüber TO werden beide Chromophore gleichzeitig angeregt. Zusätzlich wirkt TO als Lichtkollektor für JO, da die Energie entlang des Gradienten von TO auf JO übertragen wird. Die große Quantenausbeute des JO-Chromophores (bis zu 0.83) bewirkt schließlich die starke Fluoreszenzemission. Zusammen mit der gesteigerten Responsivität als Resultat der TOJO-Aggregation im Einzelstrang wurden besonders responsive ($I/I_0 = 23.3$) und helle Sonden ($\text{Br} = 28.5 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) erhalten. In Kooperation mit Dr. Imre Gaspar (Arbeitsgruppe Anne Ephrussi, EMBL-Heidelberg) konnte die Leistungsfähigkeit der TOJO-markierten Sonden in der *Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)* zur Detektion von *Oskar*-mRNA in Oozyten von *Drosophila Melanogaster* bestätigt werden (Abb. 5.1.4C-C'). Die Kombination aus Helligkeit und Responsivität ermöglichte die Etablierung eines effizienten und zeitsparenden waschfreien Protokolls zur RNA-FISH.^[226]

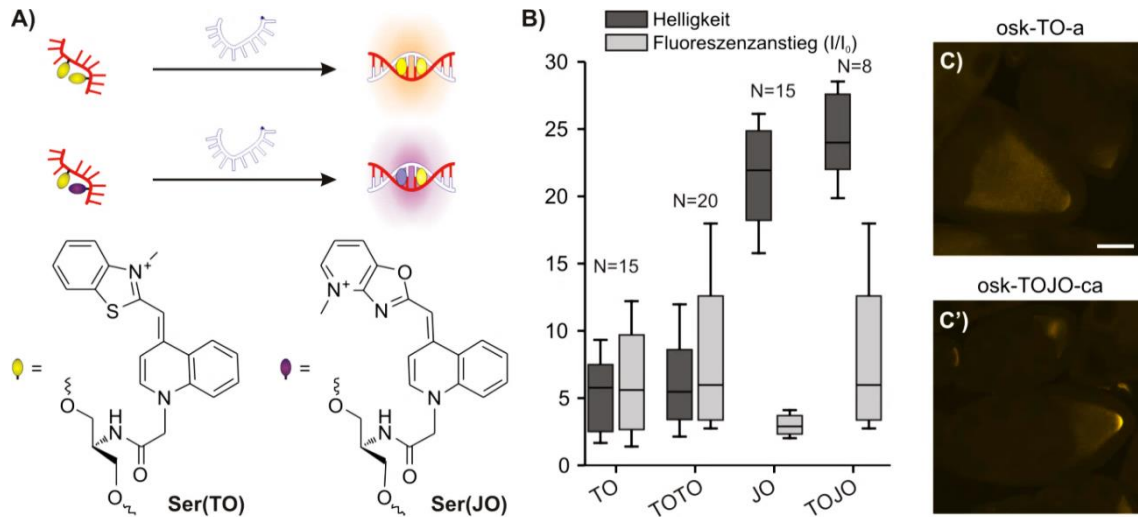


Abbildung 5.1.4: A) Schematische Darstellung der dual-markierten Sonden und chemische Strukturen von Ser(TO) und Ser(JO); B) Vergleich der Helligkeit (dunkelgrau) und Responsivität (hellgrau) der TO-, TOTO-, JO- und TOJO-FIT-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-RNA; C-C') Weitfeldmikroskopie zum Vergleich der konventionellen TO-markierten FIT-Sonden mit den TOJO-Sonden im waschfreien FISH zur Detektion von *Oskar*-mRNA in Oozyten von *Drosophila Melanogaster*.

Das Konzept der erzwungenen Interkalation bietet eine weitere Möglichkeit zur Vergrößerung der Sondenhelligkeit. Durch die Veränderung der lokalen Duplexstruktur nahe dem FIT-Reporter kann die Rotation um die zentrale Methinbrücke weiter eingeschränkt werden, sodass die Quantenausbeute ansteigt. Der Einbau von LNA in direkter Nachbarschaft zu TO steigerte den Extinktionskoeffizient (um bis zu 21%) und die Quantenausbeute (um bis zu 110%).

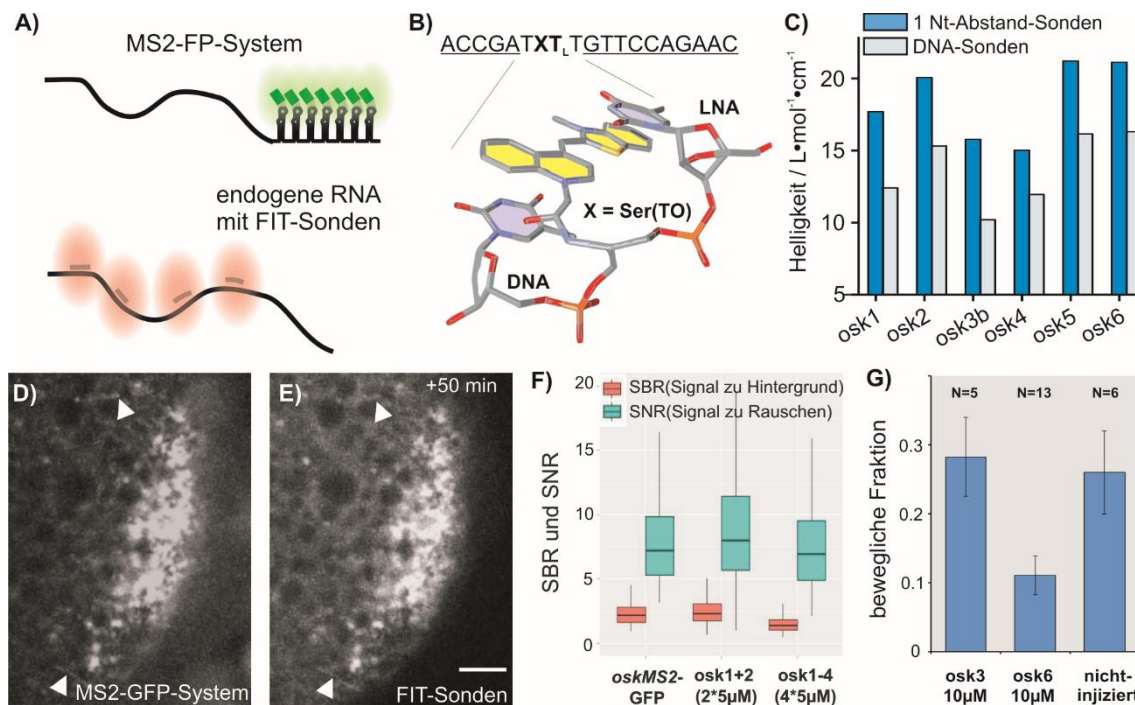


Abbildung 5.1.5: A) Schematische Darstellung zum Vergleich der RNA-Detektion mittels MS2-FP-System sowie FIT-Sonden; B) Beispielhafte Struktur des „DNA-Ser(TO)-LNA-Motivs“ für 1-Nt-Abstand FIT-Sonden; C) Vergleich der Helligkeit von 1-Nt-Abstand Sonden mit ihren entsprechenden DNA-Vorläufer-Sonden; D-F) Fluoreszenzmikroskopie zum Vergleich beider Detektionssysteme (Details siehe Kapitel 4.4.4); G) Beeinflussung der Lokalisation durch die Sonde *osk6*.

Für eine ausreichende Nukleaseresistenz *in vivo* wurde das formale „**Ser(TO)**-LNA-Dinukleotid“ beidseitig von einem DNA-Nukleotid flankiert und die übrige Sequenz durch 2'-O-Me-RNA modifiziert (Abb. 5.1.5B). Dieses Design konnte auf weitere Sondensequenzen übertragen werden und erbrachte stets gesteigerte Helligkeiten gegenüber reinen DNA-Sonden (Abb. 5.1.5C). Die Kombination mehrerer solcher Sonden konnte in der Lebendzell-Bildgebung mit dem weit verbreiteten MS2-GFP-System verglichen werden und zeigte eine ähnliche Leistungsfähigkeit in der Bildgebung und Bewegungsanalyse von *Oskar*-Ribonukleotidpartikeln (RNPs) in lebenden Oozyten von *Drosophila Melanogaster* (Abb. 5.1.5D-F). Mit LNA-verstärkten 1-Nt-Abstand-Sonden ist es möglich, endogene RNPs zu detektieren und somit auf die Expression von transgenen fluoreszenten Fusionsproteinen und RNA zu verzichten. Darüber hinaus konnte durch die gezielte Sequenzauswahl die Beweglichkeit der oskar-RNPs beeinflusst werden (Abb. 5.1.5G).

Um RNAs bzw. RNPs nicht nur zu lokalisieren, sondern zu quantifizieren, wurde das Konzept der quantitativen FIT-Sonden (qFIT) entwickelt. Diese Sonden basieren auf der internen **Ser(TO)**-Markierung als Hybridisierungsreporter sowie einem terminalen Cy7-Farbstoff als internen Standard (Abb. 5.1.6). Durch die geringe spektrale Überlappung beider Chromophore und das Vermeiden von Aggregation durch das polare DNA-Rückgrat, erwies sich Cy7 als unabhängig vom Hybridisierungszustand der Sonde und spiegelt somit die Konzentration der Sonde wider.

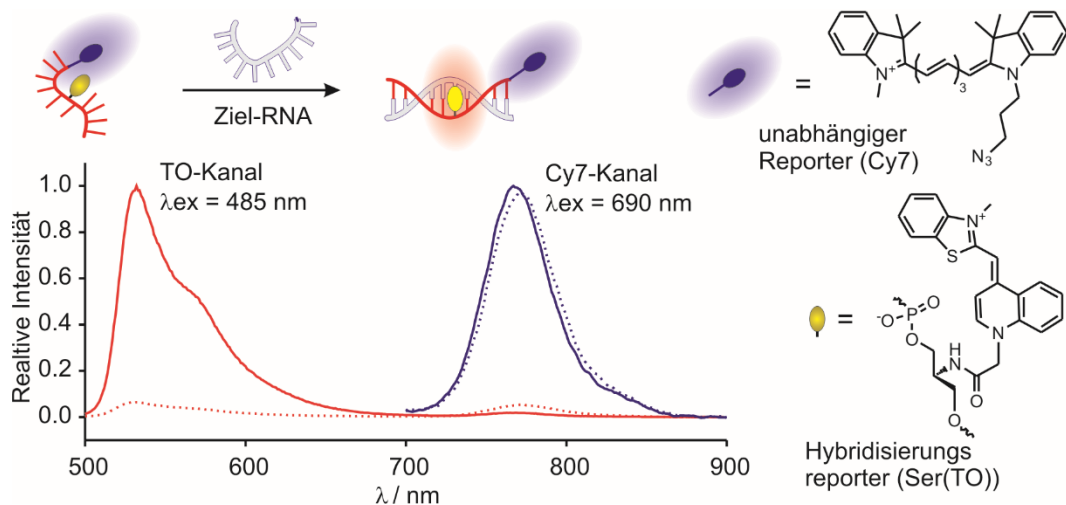


Abbildung 5.1.6: Schematische Darstellung des qFIT-Konzepts sowie exemplarische Emissionsspektren. Fluoreszenzemission im Einzelstrang (gestrichelt) und Doppelstrang (durchgezogene Linie). Die Cy7-Emission blieb bei Hybridisierung nahezu unverändert.

Die ratiometrische Messung beider Fluoreszenzkanäle ermöglichte nach externer Kalibrierung die Konzentrationsbestimmung von gebundener und ungebundener Sonde pro Pixel. Dadurch wurde es möglich, ebenfalls die Gesamt-RNA-Menge in Zellen zu bestimmen. Optische Unterschiede innerhalb der Probe konnten durch die interne Kalibrierung anhand der vergrößerten Fluoreszenzlebensdauer von hybridisierten Sonden ausgeglichen werden. Zur Mehrfarb-RNA-Detektion mit FIT-Sonden wurden über die etablierten Chromophore (BO und TO) hinaus drei neue Farbstoffderivate hergestellt, durch eine neue Methode zur post-DNA-synthetischen Farbstoffmarkierung in FIT-Sonden eingebaut und ihre

Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Thiazolrot (TR) erwies sich als hell und nicht-responsiv, während Chinolinviolett (CV) geringe Fluoreszenzintensitäten aber sehr große Responsivitäten ($I/I_0(\max) = 50$) zeigte. Als idealer Reporter für FIT-Sonden erwies sich Chinolinblau (CB), welches vergleichbare Intensitäten wie TO dabei jedoch bis zu 150-fache Fluoreszenzanstiege lieferte.

CB ist aufgrund der hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften und der Emission im roten Bereich für zelluläre Anwendungen sehr interessant. Zusätzlich konnte durch das 1-Nt-Abstand-Design die Quantenausbeute deutlich gesteigert werden, sodass helle, Nuklease-resistente Sonden erhalten wurden. Im Vergleich zu **Ser(TO)** ist die Leistungsfähigkeit der **Ser(CB)**-markierten Sonden deutlich gesteigert (Abb. 5.1.7). Durch die spektralen Unterschiede ihrer Absorption und Emission, ermöglichte die Kombination von BO-, TO- und CB-markierten Sonden die simultane Detektion drei verschiedener Ziel-RNAs in derselben Küvette. Darüber hinaus erwiesen sich TO und CB als ausgezeichnete Reporter zur Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen. So gelang die Detektion der RNA-Editierung von Cytidin zu Uridin auf zwei verschiedenen, biologisch relevanten RNA-Segmenten.

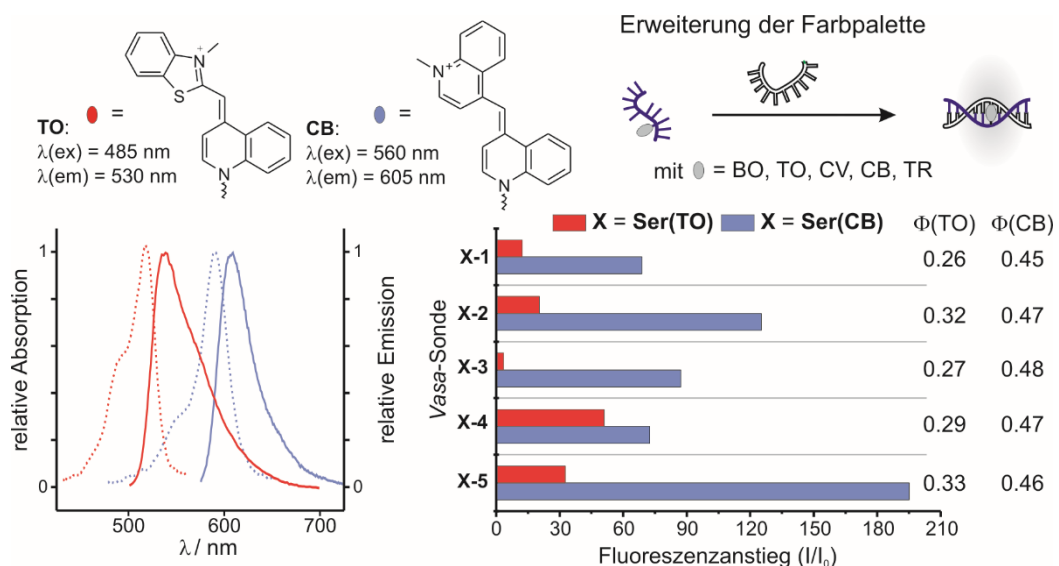


Abbildung 5.1.7: Vergleich von TO- und CB-markierten FIT-Sonden. A) Absorptions- und Emissionsspektren beider Farbstoffe (rot = TO, blau = CB); B) Vergleich des Fluoreszenzanstiegs und der Quantenausbeute von fünf 1-Nt-Abstand-Sonden mit **Ser(CB)**- bzw. **Ser(TO)**-Markierung zur Detektion von *Vasa*-mRNA.

Trotz aller Verbesserungen müssen für die effiziente RNA-Detektion *in vivo* mehrere Sondensequenzen ausgewählt, synthetisiert und charakterisiert werden, bevor die eigentliche Fragestellung adressiert werden kann. Um diesen Schritt zu vermeiden, wurden Wiederholungseinheiten für FIT-Sonden dargestellt, die als künstliche Verlängerung der RNA durch mehrere, identische FIT-Sonden gebunden werden können. Zu diesem Zweck wurden besonders leistungsfähige BO-, TO- und CB-markierte 1-Nt-Abstand-Sonden dargestellt. In Rahmen der Untersuchungen zur benachbarten Hybridisierung mehrerer Sonden konnte ein effizienter FRET von BO zu TO sowie von TO zu CB gezeigt werden. Ferner konnten verschiedene Wiederholungssequenzen dargestellt und in stabile, transgene Zelllinien kloniert werden. Die Expression der Wiederholungseinheiten sowie die Detektion durch FIT-

Sonden konnte in orientierenden Untersuchungen gezeigt werden. Diese Methode soll zukünftig die Mehrfarbdetektion von RNA mit „universellen Sonden“ ermöglichen. Zusätzlich sollte die große Anzahl an Wiederholungseinheiten (35-45 FIT-Sonden) die Einzelmoleküldetektion in lebenden Zellen ermöglichen.

5.2 Ausblick

Es besteht ein großer Bedarf an Sonden zur sequenzspezifischen RNA-Detektion in biologischen Systemen. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Sonden zur Detektion von RNA-Editierung, soll zukünftig in Kooperationen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitz-Linneweber (HU-Berlin) und Dr. Jochen Meier (MDC Berlin-Buch) Anwendung finden. Mittels waschfreier *Fluoreszenz in-situ Hybridisierung* soll durch die simultane Detektion von editierter und nicht-editierter RNA in Neuronen von Mäusen bzw. in Zellen von Tabakpflanzen einen genaueren Einblick in den Editierungsprozess ermöglichen. Die Arbeiten zur Anwendung des F-Tags in lebenden Zellen werden zurzeit von M. Sc. Dhana Friedrich (Arbeitsgruppe Dr. Alexander Löwer, MDC Berlin-Buch) durchgeführt.

Die aktuelle Forschung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Herrmann (HU-Berlin) beschäftigt sich mit der Assemblierung der acht verschiedenen viralen RNAs (vRNAs) von *Influenza*-Viren. Durch die Bereitstellung mehrerer Farbkanälen (BO, TO, CB) für FIT-Sonden, sollte es möglich sein die verschiedenen vRNAs zu detektieren und einen detaillierten Einblick in die Assemblierung neuer Viruspartikel zu erlangen. Erste Arbeiten zu diesem Projekt wurden von Jonas Steffen (Arbeitsgruppe Seitz) im Rahmen seiner Masterarbeit angefertigt. Da Chinolinviolett (CV) zwar hohe Responsivitäten, jedoch geringe absolute Intensitäten liefert, erscheint die Kombination von CV und LNA besonders vielversprechend um einen weiteren, nützlichen Farbkanal für FIT-Sonden zu erhalten. Dadurch würde die Fluoreszenzbildgebung aller acht vRNAs durch sequenzielle Verwendung verschiedener Sonden deutlich vereinfacht.

Grundsätzlich muss für die Anwendung aller Hybridisierungssonden in lebenden Zellen die Plasmamembran überwunden werden. Bisher konnte für FIT-Sonden gezeigt werden, dass Mikroinjektion und Streptolysin-O-Behandlung die Lebendzell-Bildgebung ermöglichen.^[192] Hingegen erwies sich die Verwendung von Transfektionsreagenzien, aufgrund der Bildung von fluoreszenten Aggregaten, als schwierig. In aktuellen Arbeiten von M. Sc. Jasmine Chamiolo (Arbeitsgruppe Seitz, HU-Berlin) soll die kombinierte Verwendung von Zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) und DNA-FIT-Sonden untersucht werden.^[265] Besonders vielversprechend erschienen anionischen CPPs, welche die Aggregation mit den Sonden vermeiden sollten.^[266]

FIT-PNA-CPP-Konjugate aufgrund der Abwesenheit negativer Ladungen deutlich leichter die Plasmamembran überwinden. Ferner erscheint es lohnenswert, CB in FIT-PNA zu untersuchen. Auch für FIT-PNA ist zu erwarten, dass CB eine deutlich größere Leistungsfähigkeit und vergrößerter Responsivitäten in zahlreichen Sequenzkontexten liefert. Durch die geladenen CPPs, sollte gleichzeitig die Wasserlöslichkeit der Sonden verbessert

werden, sodass die bisher bestehenden Schwierigkeiten der FIT-PNA-Sonden überwunden werden sollten.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines und Messgeräte

Reagenzien

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Rühren mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Lösemittel für Extraktionen, Flashchromatographie und Umkristallisation waren von technischer Qualität, sofern nicht anders angegeben. Die Entfernung von Lösungsmitteln im Vakuum erfolgte an einem Rotationsverdampfer des Typs *Rotavapor RE-111* der Firma *Büchi* (Flawil, Schweiz) unter Membranpumpenvakuum und bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 45 °C. Die Trocknung von Feststoffen, hochsiedenden Flüssigkeiten und Molekularsieb erfolgte im Feinvakuum, erzeugt mit einer Drehschiebervakuumpumpe des Typs *RE-6* der Firma *Vacuubrand* (Wertheim, Deutschland). Chemikalien wurden von *Sigma Aldrich* (St. Louis, USA), *Acros Organics* (Geel, Belgien), *Alfa Aesar* (Ward Hill, USA), *AppliChem* (Darmstadt, Deutschland), *TCI Europe* (Zwyndrecht, Belgien) oder *Carbolutions* (Saarbrücken, Deutschland) bezogen. Deuterierte Lösemittel wurden von *Deutero* (Kastellaun, Deutschland) oder *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zur Lagerung absolutierter Lösemittel wurde Molekularsieb der Porengröße 3-4 Å der Firma *Alfa Aesar* verwendet. Das Molekularsieb wurde unmittelbar vor dem Einsatz am Feinvakuum für mindestens sechs Stunden bei 350 °C ausgeheizt.

DNA-Oligonukleotide zur Verwendung als Zielsequenzen sowie lineare Sonden und Molecular Beacons wurden von *Biotez* (Berlin-Buch, Deutschland) erworben. RNA-Zielsequenzen wurden von *Biotez* oder *Noxxon-Pharma* (Berlin, Deutschland) bezogen. Oligonukleotide für biochemische Klonierungsarbeiten wurden von *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) erhalten.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel (60 F254) beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Laufhöhe, relativ zur Laufmittelfront, ist als R_f-Wert angegeben. Neben der Detektion der Fluoreszenzlöschung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm wurden folgende Anfärbe-reagenzien mit anschließender Wärmebehandlung verwendet:

Zucker-Reagenz: Mischung aus 100 ml 0.2%-iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 100 ml ethanolischer Schwefelsäure (2 N).

Seebach-Reagenz: Lösung von 5 g Molybdatophosphorsäure, 2 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat in 12 ml konz. Schwefelsäure und 188 ml Wasser.

Kaliumpermanganat-Lösung: 1.5 g MnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 mL of 10% NaOH in 200 mL Wasser.

Flashchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden nach dem Verfahren der Flashchromatographie durchgeführt.^[267] Es wurde Kieselgel der Korngröße 35-70 μm der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung der Laufmittel ist in Volumenverhältnissen angegeben.

Drehwerte

Zur Bestimmung der spezifischen Drehwerte wurde ein *Perkin-Elmer* (Waltham, USA) *Polarimeter 241* verwendet. Es wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 546 \text{ nm}$ und $\lambda = 578 \text{ nm}$ gemessen und auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie extrapoliert, abweichende Wellenlängen aus Literaturangaben sind jeweils angegeben. Die Messung erfolgte bei RT. Die Lösemittelkonzentrationen sind in g/100 mL angegeben.

NMR-Spektroskopie

Alle ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden an Geräten der Firma *Bruker* (Billerica, USA) des Typs *AVANCE DPX 300 MHz*, *AVANCE II 300 MHz* oder *AVANCE II 500 MHz* gemessen. Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Protonen-Restsignal der verwendeten deuterierten Lösemittel. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte gegebenenfalls unter Verwendung von COSY-, HSQC-, NOESY- und TOCSY-Experimenten. Die Multiplizität der Signal wurde folgendermaßen abgekürzt: Singulett (s), breites Singulett (bs), Dublett (d), Triplett (t), Pseudotriplett (t*), Dublett eines Dubletts (dd) sowie Multipllett (m). Die chemische Verschiebung (δ) ist in *parts per million* (ppm) angeben, Kopplungskonstanten (*J*) sind in Hertz (Hz) aufgeführt.

ESI-Massenspektrometrie

Hochaufgelöste ESI-Massenspektren (*ESI-ICT-HRMS*) wurden mit Spektrometern des Typs *LTQ FT* oder *LTQ FT Ultra* der Firma *Thermo Finnigan* (Waltham, USA) gemessen. ESI-Quadrupol-Massenspektren wurden an einem *VL-Quadrupol* Spektrometer der Serie 1100 der Firma *Agilent* (Santa Clara, USA) gemessen.

DNA-Festphasensynthese der FIT-Sonden

Die automatisierte DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *Applied Biosystems* (Foster City, USA) *Synthesizer Model 3400* bzw. einem *MerMade-4 Synthesizer* der Firma *Bioautomation* (Plano, USA). Alle verwendeten Reagenzien entsprachen der Qualitätsstufe „für DNA-Synthese“ und wurden von *Link Technologies* (Bellshill, UK), *Sigma Aldrich*, *EMP-Biotech* (Berlin, Deutschland), *Carl-Roth* sowie *Thermo-Scientific* bezogen. LNA-Monomere wurden von *Exiqon* (Vedbaek, Dänemark) bezogen. Die Synthese von 2'-O-Me-modifizierten Sonden erfolgte auf 3'-Hydroxypropyl-CPG. Alle Reagenzien, Konzentrationen der Lösungen und Synthesemethoden wurden entsprechend den Herstellerangaben für die verwendeten Phosphoramidite angepasst. Die Konzentration aller Phosphoramidite betrug 0.1 M. Für den Einbau der selbst hergestellten Phosphoramidite wurde eine Konzentration von 0.1-0.15 M in

MeCN verwendet und die Kupplungszeit auf 2x4 min (*MerMade-4*) bzw. 10 min (*ABI 3400*) verlängert.

Alle Sonden mit Ausnahme jener, die eine JO-Markierung tragen, wurden unter Verwendung von Standardamiditen (dT, dA^{Bz}, dC^{Bz} und dG^{Dmf}) hergestellt. Die Freisetzung von der Festphase und Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte durch Ammoniak (33%, aq.) für 2-2.5 h bei 55 °C. JO-markierte Sonden wurden mittels „ultramild-spaltbaren“ Schutzgruppen auf den Nukleobasen (dT, dA^{iPr-Pac}, dC^{Ac} und dG^{iPr-Pac}) sowie entsprechender *Capping*-Lösung (Pac₂O) hergestellt. Die Abspaltung der Schutzgruppen und Freisetzung von der festen Phase erfolgte durch Ammoniak (33%, aq.) für 4 h bei 25 °C.

Abspaltung und Reinigung der Oligonukleotide

Nach der Synthese wurde das CPG (*Controlled Pore Glas*) im Vakuum getrocknet und in 2 mL *Starstedt*®-Gefäße überführt. Ggf. wurde die Hälfte des CPG-Materials als Rückstellprobe bei -25 °C gelagert. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrierter Ammoniak-Lösung (33% aq., 1 mL für 1 µmol CPG, 800 µL für 0.5 µmol CPG) versetzt, 2-2.5 h bei 55 °C (bzw. 4 h bei 25 °C für JO-markierte Sonden) geschüttelt und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Ammoniak wurde mittels Vakuumzentrifugation (*SpeedVac*) entfernt, der Rückstand auf 1.0 mL verdünnt, mittels Spritzenfilter von verbleibenden CPG entfernt und mittels semipräparativer HPLC nach der DMT-on/off-Strategie gereinigt.

Die Produktfraktionen wurden vereint und durch Gefriertrocknung vom Lösemittel befreit. Zur DMTr-Abspaltung wurde der Rückstand für 30 min mit AcOH (80%, aq., 300 µL) behandelt, anschließend mit 10%-Vol. Ammoniumacetat (3 M, aq.) und 1.0 mL *i*PrOH versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min bei 14500 U/min) als Pellet erhalten und der farblose Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µL Wasser gelöst, erneut mit 10%-Vol. Ammoniumacetat (3 M, aq.) und 1.0 mL *i*PrOH versetzt und zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde verbleibendes *i*PrOH in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die Oligonukleotide wurde in 0.5-1.0 mL Wasser gelöst und mittels MALDI-TOF-MS sowie RP-HPLC analysiert. In den meisten Fällen war eine zweite HPLC-RP-Reinigung (DMT-off) notwendig.

Die Produktfraktionen wurden vereint und mittels Gefriertrocknung vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde in 150 µL Wasser gelöst, mit 10%-Vol. Ammoniumacetat (3 M, wässrig) und 1.0 mL *i*PrOH versetzt und zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Auflösen, Ausfällen und Zentrifugieren einmal wiederholt. Verbleibendes *i*PrOH wurde mittels *SpeedVac* entfernt, das Oligonukleotid in 0.5-1.0 mL Wasser gelöst, die Konzentration bestimmt und mittels MALDI-TOF-MS sowie HPLC-RP-UV/Vis analysiert.

Semipräparative HPLC

Zur Reinigung der Oligonukleotide wurde ein *1105 HPLC System* der Firma *Gilson* verwendet. Die Detektion und Fraktionierung erfolgte nach dem entsprechenden Vis-Detektorsignal (BO: 450 nm, TO: 500 nm, JO: 500 nm, CV: 540 nm, CB: 580 nm, TR: 650 nm, Cy7: 690 nm). Die Trennung erfolgte mittels einer auf 55 °C temperierten *X-Bridge BEH130 C18*-Säule (10x150mm, 5 µm) der Firma *Waters* (Milford, USA). Als mobile Phase wurde eine binäre

Mischung aus A (0.1 M Triethylamoniumacetat, pH 7.5, aq.) und B (MeCN) und folgende Gradienten verwendet:

Oligonukleotide mit terminaler DMTr-Gruppe (DMT-on):

Gradient I: 15% B - 40% B in 10 min bei einer Flussrate von 8 mL/min.

Gradient II: 15% B - 40% B in 15 min bei einer Flussrate von 4 mL/min.

Oligonukleotide ohne terminale DMTr-Gruppe (DMT-off):

Gradient III: 5% B - 20% B in 10 min bei einer Flussrate von 8 mL/min.

Gradient IV: 3% B - 20% B in 15 min bei einer Flussrate von 4 mL/min.

Oligonukleotide mit terminaler Farbstoffmarkierung:

Gradient V: 15% B - 70% B in 12 min bei einer Flussrate von 8 mL/min.

Analytische HPLC und UPLC®

Die Reinheit der hergestellten Oligonukleotide wurde mittels analytischer HPLC anhand der Absorption bei 260 nm überprüft. Dazu wurde ein *Acquity-UPLC®*-System der Firma *Waters* oder ein *1105 HPLC System* der Firma *Gilson* verwendet. Als mobile Phase wurde eine binäre Mischung aus A (0.1 M Triethylamoniumacetat, pH 7.5, aq.) und B (MeCN) verwendet.

Zur Analyse per UPLC®-RP-UV diente eine auf 50 °C temperierte *BEH 130 C18-Säule 1.7 mm (2.1x50mm, 130 Å)* der Firma *Waters* unter Verwendung von folgendem Gradienten:

Gradient VI: 3% B bis 30% B in 4 min bei einer Flussrate von 0.6 mL/min.

Zur Analyse per *Gilson-HPLC-RP-UV* wurde eine auf 55 °C temperierte *X-Bridge BEH130 C18-Säule (4.6x250mm, 5 µm)* der Firma *Waters* mit folgenden Gradienten verwendet:

Gradient VII: 5% B bis 35% B in 12 min, Flussrate 1.5 mL/min.

Gradient VIII: 3% B bis 35% B in 10 min, Flussrate 1.5 mL/min.

Gradient IX: 3% B bis 30% B in 16 min, Flussrate 1.0 mL/min.

Gradient X: 3% B bis 30% B in 20 min, Flussrate 1.0 mL/min.

Gradient XI: 10% B bis 70% B in 12 min, Flussrate 1.5 mL/min.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Massenspektren der DNA-Oligonukleotide wurden mit einer *Voyager-DE™ Biospectrometry Workstation* der Firma *PerSeptive Biosystems* oder einem *Axima-Confidence* der Firma *Kratos-Shimadzu* (Manchester, UK) aufgenommen. Messungen im positiven Modus wurden unter Verwendung von THAP- oder HPA-Matrix, Messungen im negativen Modus unter Verwendung von THAP-Matrix durchgeführt.

HPA-Matrix: 1:1 Mischung aus 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg/mL in H₂O/MeCN, 1:1) und Diammoniumcitrat (50 mg/mL in H₂O/MeCN, 1:1).

THAP-Matrix: 1:1 Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat (50 mg/mL in EtOH) und Diammoniumcitrat (50 mg/mL in H₂O/MeCN, 1:1).

UV/Vis-Spektroskopie

Konzentrationen von Oligonukleotidstocklösungen wurden mittels eines *Nanodrop*-UV/Vis-Spektrometers von *Thermo-Scientific* bestimmt. Zur exakten Konzentrationsbestimmung während den Fluoreszenzmessungen wurde ein *Cary 100 Bio* UV/Vis-Spektrometer mit *Multi-Cell-Holder* und *Temperatur-Controller* der Firma *Varian* verwendet. Die Messungen erfolgten in 1 mL- bzw. 150 µL-Küvetten der Firma *Hellma* (Müllheim, Deutschland). Um konzentrationskorrigierte Fluoreszenzintensitäten, Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten im Vis-Bereich zu erhalten, wurde vor bzw. nach jeder Fluoreszenzmessung die Konzentration der Sonden mit Hilfe der Absorption bei 260 nm bestimmt. Der jeweilige molare Extinktionskoeffizient bei 260 nm wurde nach der *nearest neighbour*-Methode mit Hilfe des im Internet bereitgestellten Programms der Firma *RiboTask* (Langeskov, Dänemark) berechnet.^[268-270] Dabei wurden die Chromophore wie ein dA-Monomer behandelt.^[199]

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur der Duplexe aus Sonde und Ziel-DNA bzw. -RNA wurde die Lösung für 5 min auf 85 °C erhitzt und anschließend auf 20 °C abgekühlt. Danach wurden in vier Zyklen von 20-85 °C mit einer Heizrate von 0.5 °C/min die Hyperchromizität der Duplexe bei 260 nm bestimmt. Die Schmelztemperaturen (T_M) ergaben sich aus dem Wendepunkt der sigmoidalen Schmelzkurven, welche automatisch durch die *Varian*-Software bestimmt wurde. Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle Messungen in PBS-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) durchgeführt.

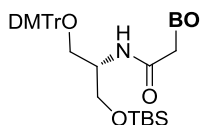
Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzemissionen wurden an einem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Varian* gemessen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Messungen in PBS Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) in 1 mL- bzw. 150 µL-Küvetten der Firma *Hellma* durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren wurden nach Erreichen der konstanten Emission ermittelt, d.h. die Fluoreszenzintensitäten der Messungen unterschieden sich nicht. Um dies zu gewährleisten, wurde nach Erreichen der Messtemperatur diese für mindestens 2 min gehalten und drei Messzyklen durchlaufen. In der Regel erfolgten die Fluoreszenzmessungen bei 25 °C, 37 °C sowie 50 °C, wobei stets der Hintergrund (nur Puffer) subtrahiert wurde.

Die temperaturabhängige Fluoreszenzmessung wurden über einen Bereich von 20–85 °C ausgeführt. Die Spektren wurden sowohl beim Heizen als auch beim Abkühlen der Proben aufgenommen. Es wurden jeweils drei Heiz- und Abkühlzyklen mit einer Rate von 1 °C/min gemessen. Die verwendeten Messbedingungen wie Konzentration, Temperatur, Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie die Schlitzbreiten sind bei den jeweiligen Daten angegeben.

6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

(S)-1-DMTr-3-TBS-Serinol-BO (15)



Carboxymethyliertes BO (**5**) (2.58 g, 8.65 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 70 mL DMF suspendiert und mit PyBOP (4.50 g, 8.65 mmol, 1.0 Äq.), PPTS (2.17 g, 8.65 mmol 1.0 Äq.) und NMM (3.80 mL, 34.6 mmol, 4.0 Äq.) versetzt. Das Serinolrückgrat (**13**) (4.53 g, 8.65 mmol) wurde in 25 mL DMF gelöst, zur Reaktionsmischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit jeweils 150 mL EtOAc und ges. NaHCO₃-Lösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde über *Celite* abfiltriert, der Filterkuchen zweimal mit EtOAc gewaschen und die vereinte organische Phase dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung sowie einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt. (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH:Me₂NEt, 89.9:10:0.1, v/v/v).

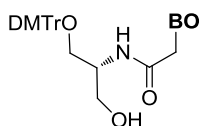
Ausbeute: 4.21 g (56%, 4.84 mmol), gelber, amorpher Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9/10/0.1, v/v/v) = 0.48.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm]: - 0.01 (3H, s, SiMe₂), 0.01 (3H, s, SiMe₂), 0.81 (9H, s, Si^tBu), 3.08 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 5.3$ Hz, CH₂), 3.18 (1H, dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 5.8$ Hz, CH₂), 3.68 (1H, dd, $J_1 = 10.1$, $J_2 = 5.9$ Hz, CH₂'), 3.75 (6H, s, 2DMT-OCH₃), 3.75 – 3.78 (1H, m, CH₂'), 3.92 (3H, s, BO-CH₃), 4.05 – 4.14 (m, 1H, CH), 5.07 (2H, s, BO-CH₂), 6.79 (1H, s, BO-CH), 6.83 (4H, d, $J = 8.9$ Hz, DMT), 7.18 – 7.33 (6H, m, BO, DMT), 7.35 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, NH), 7.37 – 7.47 (3H, m, BO), 7.68 – 7.73 (4H, m, DMT), 7.89 (1H, dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 0.7$ Hz, BO), 8.07 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, BO), 8.53 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, BO).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm]: -5.28 (SiMe₂), -5.34 (SiMe₂), 18.75 (Si^tBu-C_q), 26.13 (Si^tBu), 34.79 (BO-CH₃), 52.47 (CH), 55.86 (2DMT-OCH₃), 57.40 (BO-CH₂), 62.68 (CH₂), 62.71 (CH₂), 86.60 (DMT-C_q), 89.96 (BO-CH), 108.73 (BO-Ar), 113.89 (4DMT-Ar-CH), 123.60 (BO-Ar), 125.96 (DMT-Ar), 126.34 (BO-Ar), 127.74 (BO-Ar), 127.67 (BO-Ar), 128.78 (2DMT-Ar-CH), 128.90 (2DMT-Ar-CH), 129.33 (BO-Ar), 130.92 (2DMT-Ar), 130.93 (2DMT-Ar), 134.25 (BO-Ar), 136.88 (2DMT-Ar-C_q), 137.01 (DMT-Ar-C_q), 138.98 (BO-Ar-C_q), 141.61 (BO-Ar-C_q), 145.66 (BO-Ar), 146.09 (DMT-Ar-C_q), 150.30 (BO-Ar-C_q), 159.58 (2DMT-Ar-C_q), 165.93 (BO-CO-C_q).

(S)-1-DMTr-3-OH-Serinol-BO (17)



Zu einer Lösung aus **15** (4.21 g, 4.84 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (80 mL) wurde Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (TBAF·3H₂O, 3.05 g, 9.68 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und die Lösung bei RT für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 150 mL halbgesättigte, wässrige NaHCO₃-Lösung hinzugegeben und für weitere 15 min gerührt. Der entstandene

Niederschlag wurde filtriert, zweimal mit je 20 mL Wasser, viermal mit je 20 mL EtOAc und dreimal mit je 20 mL Et₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde zweimal mit Benzol koevaporiert und schließlich aus Benzol lyophilisiert, um Reste von Wasser zu entfernen.

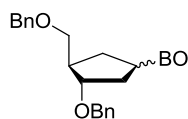
Ausbeute: 1.83 g, (50%, 2.42 mmol), gelber, amorpher Feststoff.

m/z (ESI-ICT-HRMS): 674.2672 (100%) [*M*]⁺ (ber. für C₄₀H₄₀N₃O₅S⁺: 674.2683).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm]: 3.01 (1H, bs, OH), 3.10 (1H, dd, *J*₁ = 9.2, *J*₂ = 5.3 Hz, CH₂), 3.15 (1H, dd, *J*₁ = 9.2, *J*₂ = 5.7 Hz, CH₂), 3.61 (1H, dd, *J*₁ = 11.0, *J*₂ = 5.2 Hz, CH₂'), 3.64-3.68 (1H, m, CH₂'), 3.67 (3H, s, BO-CH₃), 3.75 (6H, s, DMT-OCH₃), 4.04 – 4.12 (1H, m, CH), 4.77 (2H, q, *J* = 16.2 Hz, BO-CH₂), 6.05 (s, 1H, BO-CH), 6.83 – 6.88 (4H, m, DMT), 6.96 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, NH), 7.21 – 7.34 (10H, m, 2xBO, 8xDMT), 7.40 – 7.45 (3H, m, 2xBO, 1xDMT), 7.50 – 7.54 (1H, m, BO), 7.76 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, BO), 7.80 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, BO).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm]: 33.74 (BO-CH₃), 52.76 (CH), 55.81 (2DMT-OCH₃), 60.05 (BO-CH₂), 61.98 (CH₂), 63.06 (CH₂'), 90.95 (BO-CH), 100.89 (DMT-C_q), 112.96 (2BO-Ar), 113.93 (4DMT-Ar), 123.25 (2BO-Ar), 124.84 (DMT-Ar), 127.73 (2BO-Ar), 128.73 (2DMT-Ar), 128.84 (BO-Ar), 128.92 (2DMT-Ar), 130.86 (4DMT-Ar), 136.88 (2DMT-Ar-C_q), 136.95 (BO-Ar-C_q), 142.56 (BO-Ar), 143.33 (BO-Ar-C_q), 145.97 (DMT-Ar-C_q), 152.10 (BO-Ar-C_q), 159.5 (2DMT-Ar-C_q), 166.0 (BO-CO-C_q).

α/β-(D)-5',3'-Dibenzyl-6'-C-2'-deoxyribofuranose(BO) (23)



Bei RT und unter Argonatmosphäre wurde α-(D)-5',3'-Dibenzyl-6'-C-2'-deoxyribofuranosyl-1'-methansulfonat (**22**, hergestellt nach Referenz^[198, 211]) (2.50 g, 6.40 mmol, 1.0 Äq) zusammen mit 4-Picolin (5.96 g, 64.02 mmol, 6.50 ml, 10.0 Äq.) für 48 h auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde auf RT abgekühlt, der braune Rückstand mit 120 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 3-Methyl-2-methylthiothiazolopyridiniumtosylat (5.10 g, 13.85 mmol, 2.2 Äq.) sowie NEt₃ (2.66 g, 24.34 mmol, 3.70 ml, 3.8 Äq.) versetzt. Die intensiv gelbe Suspension wurde über Nacht unter Lichtausschluss gerührt, bevor viermal mit je 100 ml HCl-Lösung (1 M) gewaschen wurde. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die weitere Reinigung erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH:Me₂NEt; 89.5:10:0.5, v/v/v), wobei eine Diastereomerenmischung (β/α = 3.3:1) isoliert wurde.

Ausbeute: 3.06 g (4.33 mmol, 67 %) gelber, amorpher Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9:10:0.1, v/v/v) = 0.36.

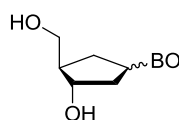
m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 535.2399 (100%) [*M*]⁺ (ber. für C₃₄H₃₅N₂O₂S⁺: 535.2414).

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, 2 Diastereomere): δ [ppm] = 1.77 (0.29H, m), 1.92 (0.71H, m), 2.04 (1H, m), 2.20 (2.4H, s, Ts-CH₃), 2.27 (1H, m), 2.38 (0.28H, m), 2.49 (0.28H, m), 2.57 (0.71H, m), 2.67 (0.72H, m), 3.32 (1.53H, m, H5'), 3.51 (0.45H, m, H5'), 3.58 (3H, m CH₃), 3.96 (1H, m, H3'), 4.41 (4H, m, 2Bn-CH₂), 4.77 (0.22H, m, H1'), 5.20 (0.78H, m, H1'), 5.93 (0.76H, s, -CH=), 5.99

(0.25H, s, -CH=), 7.01 (1.6H, d 2Ts-ArH), 7.12 (2H, m, 2BO-ArH), 7.20-7.35 (13.2H, m, 2Ts-ArH, 10Bn-ArH, 2BO-ArH), 7.44 (1H, d, BO-ArH), 7.79 (1.5H, m, BO-ArH), 8.21 (0.5H, d, BO-ArH), 8.41 (1.5H, m, BO-ArH).

^{13}C -NMR: (75 MHz, CDCl_3 , 2 Diastereomere): δ [ppm] = 21.3 (Ts- CH_3), 33.2 (CH_3), 34.8 ($\text{C4a}'$), 36.2 ($\text{C4a}'$), 39.1 ($\text{C2}'$), 39.6 ($\text{C2}'$), 44.8 ($\text{C4}'$), 45.4 ($\text{C4}'$), 67.2 ($\text{C1}'$), 67.5 ($\text{C1}'$), 71.0 (CH_2), 71.0 (CH_2), 71.1 (CH_2), 71.4 (CH_2), 73.3 (CH_2), 73.4 (CH_2), 80.5 ($\text{C3}'$), 81.5 ($\text{C3}'$), 90.1 (-CH=), 90.4 (-CH=), 111.3 (BO-ArCH), 119.6 (2BO-ArCH), 122.1 (BO-ArCH), 123.6 (BO-ArCH), 123.9 (BO-ArC_q), 124.0 (BO-ArC_q), 126.2 (2Ts-ArCH), 127.7, 127.7, 127.8, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.5 (1BO-ArCH, 10Bn-ArCH, 2Ts-ArCH), 137.9 (Bn-ArC_q), 138.1 (2xBn-ArC_q), 138.8 (Bn-ArC_q), 139.4 (BO-ArC_q), 140.0 (BO-ArCH), 140.4 (Ts-ArC_q), 144.3 (Ts-ArC_q), 150.9 (BO-ArC_q), 151.2 (BO-ArC_q), 157.5 (BO-ArC_q), 157.7 (BO-ArC_q).

α/β -(D)-6'-C-2'-Deoxyribofuranose(BO) (**24**)



Bei 0 °C wurden **23** (3.06 g, 4.33 mmol, 1.0 Äq.) in 100 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus Bortribromid (1.08 ml, 11.13 mmol, 2.6 Äq. in 10 ml Dichlormethan) versetzt. Die Mischung wurde 15 min bei 0 °C gerührt, mit 100 ml ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt, auf RT erwärmt und weitere 2 h gerührt. Der gelbe Feststoff wurde filtriert, dreimal mit je 15 ml CH_2Cl_2 gewaschen und anschließend in 100 ml DMSO gelöst. Es wurde erneut filtriert und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde ohne zusätzliche Reinigung weiterverwendet.

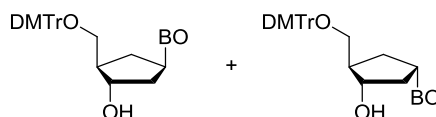
Ausbeute: quantitativ, gelber Feststoff, Diastereomerenverhältnis: α/β = entsprechend dem eingesetzten Startmaterial.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 90:10:0.1, v/v/v) = 0.15.

m/z (ESI(+)-MS): 355.25 (100%) [M]⁺ (ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$: 355.15).

^1H -NMR: (300 MHz, DMSO-d_6 , zwei Diastereomere): δ [ppm] = 1.66 (0.15H, m), 1.90 (0.85H, m), 2.14 (3H, m), 3.30-3.55 (2H, m, $\text{H5}'$), 3.73 (3H, s, BO- CH_3), 4.20 (0.85H, m, $\text{H1}'$), 4.10 (0.15H, m, $\text{H1}'$), 5.07 (0.15, m, $\text{H3}'$), 5.35 (0.85H, m, $\text{H3}'$), 6.32 (1H, m, BO-H), 7.92 (1H, m, BO-H), 7.41 (2H, m, BO-H), 7.51 (1H, m, BO-H), 7.60 (1H, m, BO-H), 7.92 (1H, m, BO-H), 8.55 (2H, m, BO-H).

α/β -(D)-5'-DMTr-6'-C-2'-deoxyribofuranose(BO) (**25 α/β**)



Bei RT wurde α/β -(D)-6'-C-2'-deoxyribofuranose(BO) (**24**) (600 mg, 1.38 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL trockenem Pyridin unter Argonatmosphäre vorgelegt und mit KPF_6 (1.27 mg, 6.90 mmol, 5.0 Äq.), EtNiPr_2 (1.78 g, 13.8 mmol, 2.29 mL, 10.0 Äq.) sowie DMTrCl (1.40 g, 4.14 mmol, 3.0 Äq.) versetzt und über 16 h gerührt. Danach wurden 10 mL MeOH zugesetzt und

noch 1 h bei RT gerührt. Es wurden CH₂Cl₂ und ges. NaHCO₃-Lös. (aq.) zugesetzt, die organische Phase separiert und dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 2 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und durch Zugabe von Et₂O das Rohprodukt ausgefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und die Mutterlauge verworfen. Dieselbe Prozedur wurde noch einmal wiederholt. Die weitere Reinigung erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9:10:0.1, v/v/v), wobei die Trennung des Diastereomerengemisches erfolgte.

Ausbeute: 787 mg (0.980 mmol, 71 %), gelber Feststoff; Diastereomerenverhältnis: α/β = entsprechend dem eingesetzten Startmaterial. (α : 629 mg, 0.784 mmol, 57%; β : 158 mg, 0.196 mmol, 14%)

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9:10:0.1, v/v/v) = 0.70-0.78.

β -(D)-5'-DMTr-6'-C-2'-deoxyribofuranose(BO) (25 β):

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 657.2788 (100%) [M]⁺ (ber. für C₄₁H₄₁N₂O₄S⁺: 657.2782).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 1.65 (1H, m, H4a'b), 2.19 (3H, m, H4', H2'a, H2'b), 2.57 (1H, m, H4a'a), 3.20 (2H, m, H5'a, H5'b), 3.66 (3H, s, BO-H14), 3.77 (6H, s, DMT-OCH₃), 4.22 (1H, m, H3'), 4.82 (1H, m, H1'), 6.04 (1H, s, BO-H6), 6.87 (4H, m, 4DMT-ArH), 7.26 (3H, m, 1DMT-ArH, BO-H3, BO-H4), 7.30-7.36 (7H, m, 6DMT-ArH, BO-H10), 7.44 (3H, m, 2DMT-ArH, BO-H12), 7.52 (1H, m, BO-H11), 7.77 (1H, m, BO-H9), 7.99 (2H, m, BO-H1, BO-H5).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 33.7 (BO-C14), 36.2 (C4a'), 41.9 (C2'), 48.2 (C4'), 55.8 (2DMT-OCH₃), 64.9 (C5'), 67.3 (C1'), 73.2 (C3'), 86.9 (DMT-C_q), 90.5 (BO-C6), 112.8 (BO-C12), 114.0 (4DMT-ArCH), 119.5 (BO-C3, BO-C4), 123.1 (BO-C9), 124.7 (BO-C10), 124.8 (BO-C8), 127.8 (DMT-ArCH), 128.8 (2DMT-ArCH), 128.8 (BO-C11), 129.0 (2DMT-ArCH), 130.9 (2DMT-ArCH), 131.0 (2DMT-ArCH), 137.0 (DMT-ArC_q), 137.1 (DMT-ArC_q), 140.3 (BO-C1, BO-C5), 141.7 (BO-C13), 146.1 (DMT-ArC_q), 152.4 (BO-C3), 159.3 (BO-C7), 159.6 (2DMT-ArC_q).

α -(D)-5'-DMTr-6'-C-2'-deoxyribofuranose(BO) (25 α):

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 657.2789 (100%) [M]⁺ (ber. für C₄₁H₄₁N₂O₄S⁺: 657.2782).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 1.88 (1H, m, H2'a), 2.19 (3H, m, H4a'a, H4a'b), 2.39 (1H, m, H4'), 2.53 (1H, m, H2'b), 3.07 (2H, m, H5'a, H5'b), 3.36 (1H, d, J = 3.6, 3'-OH), 3.63 (3H, s, BO-H14), 3.78 (6H, s, 2DMT-OCH₃), 4.17 (1H, m, H3'), 4.63 (1H, m, H1'), 6.00 (1H, s, BO-H6), 6.89 (4H, m, 4DMT-ArH), 7.27 (4H, m, DMT-ArH, BO-H3, BOH4, BO-H10), 7.33 (6H, m, 6DMT-ArH), 7.38 (1H, m, BO-H12), 7.46 (2H, m, DMT-ArH), 7.49 (1H, m, BO-H11), 7.71 (1H, m, BO-H9), 8.13 (2H, m, BO-H1, BO-H5).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 33.6 (BO-C14), 36.3 (C4a'), 42.4 (C2'), 48.8 (C4'), 55.9 (2DMT-OCH₃), 64.9 (C5'), 68.3 (C1'), 74.4 (C3'), 86.9 (DMT-C_q), 90.5 (BO-C6), 112.7 (BO-C12), 114.0 (4DMT-ArCH), 118.5 (BO-C3, BO-C4), 123.3 (BO-C9), 124.6 (BO-C10), 124.8 (BO-C8), 127.8 (DMT-ArCH), 128.8 (2DMT-ArCH, BO-C11), 129.0 (2DMT-ArCH), 131.0 (4DMT-ArCH), 137.2 (DMT-ArC_q), 140.8 (BO-C1, BO-C5), 141.7 (BO-C13), 146.3 (DMT-ArC_q), 152.1 (BO-C3), 159.1 (BO-C7), 159.6 (2DMT-ArC_q).

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von Phosphoramiditen

Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde der entsprechende Alkohol (1 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (ca. 0.05 M) gelöst, mit $\text{EtN}(\text{iPr})_2$ (6 Äq.) sowie 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (3 Äq.) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH_2Cl_2 verdünnt, dreimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung sowie einmal mit ges. NaCl -Lösung extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde zweimal mit Benzol koevaporiert, um möglicherweise verbleibendes Wasser zu entfernen. Zur DNA-Synthese wurde das Produkt in abs. MeCN gelöst (0.1 - 0.15 M) und über Molekularsieb gelagert. Die erzielten Ausbeuten lagen zwischen 70 und 90%, wurden jedoch aufgrund der Schutzgas-Atmosphäre nicht für jede Phosphitylierungsreaktion bestimmt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Echtzeit-PCR wurde an einem *iQ-Thermocycler* der Firma *BioRad* (Hercules, USA) unter Verwendung des FAM-Filtersatzes durchgeführt. Der PCR-Mastermix bestehend aus Argon-gesättigtem Wasser, *High Specificity S*-Reaktionspuffer (1×), *Enhancer Solution-P*, MgCl_2 (2.5 mM) und dem dNTP-Mix (200 μM dNTPs) sowie die Taq-Polymerase (1 u) wurde von *Peqlab Biotechnologies* (Erlangen, Deutschland) bezogen. Folgende *Primer* wurden von *Biotez* (Berlin-Buch, Deutschland) bezogen und in der Konzentration von 400 nM verwendet: vorwärts: CTTGGTCAGCAAGTGCATGT; rückwärts: CTCGGGCCATCAG-TCATTAT. Diese *Primer* sind spezifisch für die Amplifizierung des Segments von Position 496 bis 684 der *Influenza-H1N1-A/PR/8-Neuraminidase*.

Als Template diente cDNA von *Influenza-A/H1N1-Puerto-Rico-Typ* infizierten MDCK-Zellen, welche freundlicherweise von Matthias Schade (Arbeitsgruppe Andreas Hermann, HU-Berlin) zu Verfügung gestellt wurde. Zur PCR wurde jeweils 1 μL Templat-Lösung verwendet (100 ng/ μL , 10 ng/ μL , 1 ng/ μL , 100 pg/ μL , 10 pg/ μL , 1 pg/ μL and 100 fg/ μL , 10 fg/ μL). In der Templat-freien Kontrolle (NTC, no template control) wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. Zur Kontrolle wurde ebenfalls cDNA nicht-infizierter MDCK-Zellen (10 ng/ μL) verwendet, welche ebenfalls von Matthias Schade zur Verfügung gestellt wurde.

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis gekühlt vorbereitet und als Triplikate (3x20 μL) analysiert. Die Lösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt, mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgedeckt, zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und anschließend folgendem Thermozyklierungsprogramm unterzogen: initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 min gefolgt von 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (95 °C, 10 s), *Primer*-Anlagerung (57.5 °C, 30 s.) und Kettenverlängerung (72 °C, 20 s). Abschließend wurde auf 4 °C abgeköhlt. Die Fluoreszenz wurde stets im Anlagerungsschritt jedes Zyklus gemessen.

Vergleich von FIT-Sonde und Molecular Beacon

Für Fluoreszenzmessungen in biologischer Matrix wurde Lysat von 10^5 MDCK-Zellen pro mL Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.8 % Detergenz: PN-40, pH 7.4) verwendet. Das Zelllysate wurde von freundlicherweise von Matthias Schade (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Hermann, HU-Berlin) bereitgestellt.

Zum vollständigen Verdau der Sonden wurden 0.675 nmol der jeweiligen Sonde mit 40 μ L DNase-I-Lösung (0.44 mg/mL, in PBS-Puffer) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einer Sondenkonzentration von 1 μ M und 5 μ M RNA bei Zugabe; im jeweiligen Medium unter Anregung bzw. Auslesung der folgenden Wellenlängen: TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, TAMRA (MB): $\lambda(\text{ex}) = 540 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 555\text{-}770 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

Die zeitabhängigen Fluoreszenzmessungen während dem DNase-I-Verdau erfolgten in 150 μ L-Küvetten. Zunächst wurde die Einzelstrangfluoreszenz (I_0) für 3 min gemessen, anschließend erfolgte die Zugabe von frisch bereiteter DNase-I-Lösung (10 μ L, 0.05 mg/mL in PBS-Puffer), sodass eine Sondenkonzentration von 0.1 μ M erhalten wurde. Nach 32 min wurde 0.75 nmol Ziel-RNA zugesetzt und die Fluoreszenz für weitere 3 min aufgezeichnet.

Über den gesamten Zeitraum erfolgte die Detektion folgenden Wellenlängen:

TO: $\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$ slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

TAMRA: $\lambda(\text{ex}) = 540 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 580 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.1

Tabelle 6.2.1: Analytische Daten der **Ser(TO)**-markierten Sonden zur Detektion von β -Aktin-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^a		R_T / min^b
		ber. $[M-2H]^-$	gefunden	
akt-01	ACACAGAG X ACTTGCGCT	5662	5660	1.62
akt-02	CACAGAGT X CTTGCGCTC	5627	5629	1.58
akt-03	ACAGAGT X TTGCGCTCA	5677	5680	1.77
akt-04	CAGAGTAC X TGCGCTCAG	5678	5676	1.68
akt-05	AGAGTACT X GCGCTCAGG	5718	5720	1.96
akt-06	GAGTACTT X CGCTCAGGG	5709	5705	1.92
akt-07	AGTACTTG X GCTCAGGGG	5749	5749	1.97
akt-08	GTACTTGC X CTCAGGGGG	5725	5720	1.80
akt-09	TACTTGCG X TCAGGGGGT	5740	5339	1.89
akt-10	ACTTGCGC X CAGGGGGTG	5750	5748	1.87

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

Tabelle 6.2.2: Analytische Daten der **β -cRib(BO)**-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = β-cRib(BO)	MALDI-TOF-MS ^a		R_T / min^b
		ber. $[M-2H]^-$	gefunden	
neu-01	GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	8403	8403	1.99
neu-02	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	8394	8396	1.97
neu-03	GGTTTCAGTT X TATGCCGTTGTATTT	8403	8403	1.93
neu-04	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	8403	8403	1.95
neu-05	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8394	8395	1.97
neu-06	GGTTTCAGTTATT X GCCGTTGTATTT	8403	8403	1.91
neu-07	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	8378	8375	1.90
neu-08	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8418	8418	1.83
neu-09	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	8418	8419	1.91
neu-10	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	8378	8375	1.92

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

Tabelle 6.2.3: Analytische Daten der **α -cRib(BO)**-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = α-cRib(BO)	MALDI-TOF-MS ^a		R_T / min^b
		ber. $[M-2H]^-$	gefunden	

6.2. Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

neu-01	GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	8403	8402	1.97
neu-02	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	8394	8394	1.95
neu-03	GGTTTCAGTTA X TATGCCGTTGTATTT	8403	8403	1.88
neu-04	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	8403	8404	1.93
neu-05	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8394	8394	1.97
neu-06	GGTTTCAGTTATT A X GCCGTTGTATTT	8403	8404	1.98
neu-07	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	8378	8375	2.00
neu-08	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8418	8418	1.96
neu-09	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	8418	8376	1.96
neu-10	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	8378	8375	1.91

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

Tabelle 6.2.4: Analytische Daten der **Ser(BO)**-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(BO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min
		ber.	gefunden	
neu-01	GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	8423 ^[a]	8422	9.74 ^c
neu-02	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	8412 ^[b]	8416	18.17 ^d
neu-03	GGTTTCAGTTA X TATGCCGTTGTATTT	8423 ^[a]	8423	9.72 ^c
neu-04	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	8423 ^[a]	8423	9.78 ^c
neu-05	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8412 ^[b]	8416	18.29 ^d
neu-06	GGTTTCAGTTATT A X GCCGTTGTATTT	8421 ^[b]	8427	18.54 ^d
neu-07	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	8398 ^[a]	8399	9.63 ^c
neu-08	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8438 ^[a]	9439	9.62 ^c
neu-09	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	8436 ^[b]	8434	1.90 ^e
neu-10	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	8396 ^[b]	8395	1.90 ^e

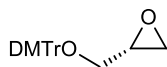
[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix im negative Modus, [M-2H]⁻; [b] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix im positiven Modus, [M]⁺; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII; [d] analytische HPLC-RP-UV, Gradient X; [e] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

Tabelle 6.2.5: Analytische Daten der **Ser(TO)**-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
neu-TO-a	GGTTTC X GTTATTATGCCGTTGTATTT	8464	8463	2.08
neu-TO-b	GGTTTC A X TTATTATGCCGTTGTATTT	8448	8446	2.11
neu-TO-c	GGTTTCAGT X TATTATGCCGTTGTATTT	8473	8471	2.04
neu-TO-d	GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	8473	8471	2.08
neu-TO-e	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	8464	8463	2.14
neu-TO-f	GGTTTCAGTTA X TATGCCGTTGTATTT	8473	8470	2.11
neu-TO-g	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	8473	8478	2.09
neu-TO-h	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8464	8460	2.12
neu-TO-i	GGTTTCAGTTATT A X GCCGTTGTATTT	8473	8469	2.11
neu-TO-j	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	8448	8444	2.09
neu-TO-k	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8488	8490	2.08
neu-TO-l	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	8488	8488	2.10
neu-TO-m	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	8448	8447	2.13
neu-TO-n	GGTTTCAGTTATTATGCCG X TGTATTT	8473	8476	2.08
neu-TO-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGT X GATTTT	8473	8470	2.05
neu-EHP	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT-C ₃	8602	8601	2.12

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

(R)-2-Dimethoxytrityloxymethyl-oxiran (34)

Zu einer Lösung aus (S)-Glycidol (**33**) (1.00 mL, 15.10 mmol, 1.0 Äq.) und NEt₃ (5.40 mL, 40.70 mmol, 2.7 Äq.) in 40 mL CH₂Cl₂ wurden DMTrCl (6.45 g, 19.00 mmol, 1.26 Äq.) in zwei Portionen zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Mischung mit 50 mL CH₂Cl₂ verdünnt und zweimal mit je 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: cHex/EtOAc/NEt₃, 89.9:10:0.1, v/v/v).

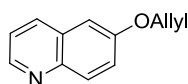
Ausbeute: quantitativ (15.10 mmol), hellgelbes Öl.

R_f (cHex/EtOAc/Net3, 89.9:10:0.1, v/v/v) = 0.21.

$[\alpha]_D^{24} = +7.1^\circ$.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.50 – 7.46 (2H, m, H_{aryl}), 7.40 – 7.35 (4H, m, H_{aryl}), 7.30 (2H, m, H_{aryl}), 7.25 – 7.18 (1H, m, H_{aryl}), 6.86 – 6.84 (4H, m, H_{aryl}), 3.79 (6H, s, 2xOCH₃), 3.34 (1H, dd, J = 10.0, 2.3 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.18 – 3.10 (2H, m, $\frac{1}{2}$ CH₂ CH), 2.78 (1H, dd, J = 5.1, 4.2 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂(Oxiran)), 2.63 (1H, dd, J = 5.2, 2.5 Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂(Oxiran)).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 158.62 (2xC_q-OMe), 144.92(C_q), 136.15(C_q), 136.11 (C_q), 130.14 (4xCH_{aryl}), 128.26 (2xCH_{aryl}), 127.93 (2xCH_{aryl}), 126.88 (CH_{aryl}), 113.25 (4xCH_{aryl}), 86.23 (C_q) 64.71 (CH₂), 55.30 (2xCH₃, O-Me), 51.20 (CH), 44.75 (CH₂(Oxiran)).

6-Allyloxychinolin (32)

Bei 0 °C wurde 6-Hydroxychinolin (**31**) (2.00 g, 13.78 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 30 mL THF, mit Natriumhydrid (0.42 mg, 16.54 mmol, (ca. 90%) 1.2 Äq.) versetzt und 5 min bei derselben Temperatur gerührt. Zu der erhaltenden Suspension wurde Allylbromid (1.44 mL, 2.00 g, 16.54 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 30 mL Wasser beendet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der braune Rückstand wurde mit je 50 mL Wasser und CH₂Cl₂ aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase zwei Mal mit je 25 mL CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: cHex/EtOAc, 1:1, v/v).

Ausbeute: 2.12 g (11.44 mmol, 83%), braunes Öl.

R_f (cHex/EtOAc, 1:1, v/v) = 0.45.

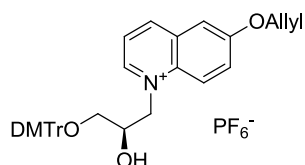
m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 186.0913 (100%) [M+H]⁺ (ber. für C₁₂H₁₂ON⁺: 186.0913).

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.75 (1H, dd, J = 4.2, 1.7 Hz, H₁), 8.03 – 7.94 (2H, m, H₃, H₅), 7.39 (1H, dd, J = 9.2, 2.8 Hz, H₈), 7.31 (1H, dd, J = 8.3, 4.2 Hz, H₂), 7.05 (1H, d, J = 2.8 Hz,

H₇), 6.10 (ddt, $J = 17.2, 10.5, 5.3$ Hz, CH=), 5.46 (1H, dq, $J = 17.3, 1.6$ Hz, $\frac{1}{2}$ =CH₂), 5.32 (1H, dq, $J = 10.5, 1.4$ Hz, $\frac{1}{2}$ =CH₂), 4.64 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 4.63 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 156.7 (C_q), 148.1 (CH₁), 144.6 (C_q), 134.9 (CH₃), 132.9 (CH₅), 131.0 (=CH), 129.3 (C_q), 122.6 (CH₈), 121.4 (CH₂), 118.1 (=CH₂), 106.5 (CH₇), 69.1 (OCH₂).

(R)-6-(Allyloxy)-1-(3-dimethoxytritylmethoxy-2-hydroxypropyl)chinolinium-hexafluorophosphat (35)



6-Allyloxychinolin (**32**) (1.64 g, 8.85 mmol, 1.0 Äq.) und (R)-2-Dimethoxytrityloxymethyloxiran (**34**) (3.33 g, 8.85 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 30 mL CH₂Cl₂ gelöst und eine Spatelspitze festes NaHCO₃ zugegeben. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise BF₃·Et₂O (1.09 mL, 8.85 mmol, 1.0 Äq.) zugesetzt. Die rote, klare Lösung wurde 3 h bei RT gerührt bevor KPF₆ (1.63 g, 8.85 mmol, 1.0 Äq.) zugesetzt und weitere 15 min gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 mL NaHCO₃-Lösung versetzt, die organische Phase einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 94.9/5/0.1).

Ausbeute: 1.88 g (2.66 mmol, 30%), hellgelber, amorpher Feststoff,

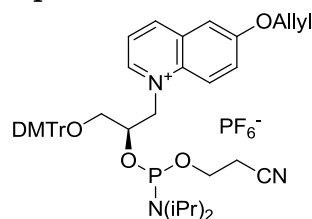
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +29.9^\circ$.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9/10/0.1) = 0.46.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 562.2587 (100%) $[M]^+$ (ber. für C₃₆H₃₆O₅N⁺: 562.2588).

¹H-NMR: (300 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 8.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, Chinolin-H₂), 8.84 (dd, $J = 5.8, 1.1$ Hz, Chinolin-H₄), 8.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, Chinolin-H₈), 7.89 (1H, dd, $J = 8.4, 5.8$ Hz, Chinolin-H₃), 7.77 (1H, dd, $J = 9.7, 2.9$ Hz, Chinolin-H₇), 7.67 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, Chinolin-H₅), 7.49 (2H, dd, $J = 8.4, 1.3$ Hz, H_{aryl}-DMTr), 7.38 – 7.30 (6H, m, H_{aryl}-DMTr), 7.29 – 7.21 (1H, m, H_{aryl}-DMTr), 6.95 – 6.82 (4H, m, H_{aryl}-DMTr), 6.15 (1H, ddt, $J = 17.3, 10.6, 5.3$ Hz, =CH-Allyl), 5.52 (1H, dq, $J = 17.3, 1.6$ Hz, $\frac{1}{2}$ =CH₂-Allyl), 5.41 – 5.32 (1H, m, $\frac{1}{2}$ =CH₂-Allyl), 5.17 (1H, dd, $J = 14.2, 3.1$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂CH), 4.80–4.72 (3H, m, $\frac{1}{2}$ CH₂CH, CH₂-Allyl), 4.16 – 4.14 (1H, m, CH), 3.77 (6H, s, 2xOMe), 3.31 (1H, dd, $J = 10.0, 4.8$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂ODMTr), 3.22 (1H, dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂ODMTr).

¹³C-NMR: (75 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 159.75(C_q), 159.6 (C_q), 147.99 (Chinolin-C₄), 147.0 (Chinolin-C₂), 145.9 (C_q), 136.7 (C_q), 136.7 (C_q), 135.1 (C_q), 133.3 (CH-Allyl), 133.2 (C_q), 131.0 (C_{aryl}), 129.2(C_{aryl}), 129.0 (C_{aryl}), 128.9 (Chinolin-H₇), 128.0 (Chinolin-H₃), 122.9 (Chinolin-C₈), 121.5 (Chinolin-C₅), 119.2 (CH₂-Allyl), 114.2 (C_{aryl}), 110.0 (Chinolin-C₅), 87.5 (C_q-DMTr), 70.5 (CH₂-Allyl), 69.3 (CHOH), 66.0 (CH₂ODMTr), 61.5 (CH₂), 56.0 (2xOCH₃).

6-(allyloxy)-1-((2R)-3-Dimethoxytrityl-2-(2-cyanoethyl-diisopropylaminophosphino)oxy)propyl)chinoliniumhexafluorophosphat (36)

Zu einer Lösung aus **35** (400 mg, 564 μmol , 1.0 Äq.) und NEt_3 (350 μL , 2.50 mmol, 4.4 Äq.) in 20 mL CH_2Cl_2 , wurde tropfenweise 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (350 μL , 1.41 mmol, 2.5 Äq.) zugesetzt. Es wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 95/5/0.2). Das erhaltene Produkt wurde in 50 mL Benzol gelöst und lyophilisiert.

Ausbeute: 300 mg (350 μmol , 62%) gelb-grüner Feststoff.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 89.9/10/0.1) = 0.55.

^{31}P -NMR: (121 MHz, CDCl_3 , 2 Diastereomere) δ [ppm] = 150.6, 149.8 (P(III)), 14.9 (P(V)), -132.0, -137.9, -143.8, -149.6, -155.5 (PF_6^-).

Präparative HPLC zur Reinigung von 6HC-modifizierter DNA

Das Gly(6HC)-tragende Oligonukleotide wurde im 240 μmol -Maßstab mit freundlicher Unterstützung durch die *Noxxon Pharma AG* (Berlin, Deutschland) an einem *ÄKTA Oligopilot* (Chalfont St Giles, UK) durchgeführt. Zur Abspaltung der Allylgruppe wurden 10 μmol des CPG in einem Spritzenreaktor mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (100 μmol , 115 mg, 10 Äq.) sowie *N*-Methylanilin (2.30 mmol, 150 μL , 230 Äq.) in 4 mL DCM versetzt und für 2 h bei 40 °C inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und das CPG mit CH_2Cl_2 (3x), MeCN (3x), Wasser (3x), Natriumdiethyldithiocarbamat-Lösung (0.05 M, 3x), Wasser (1x) und MeCN (3x) gewaschen. Das CPG wurde im Vakuum getrocknet, in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 5 mL Methylamin (40% aq.) versetzt und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Die Lösung wurde der Festphase befreit, der Rückstand mit EtOH gewaschen und das vereinte Filtrat im Vakuum eingengt. Die Reinigung erfolgte mittels einer präparativen HPLC (*1100 Series*) der Firma *Agilent Technologies* unter Verwendung einer *X-Bridge Prep C18 OBD*-Säule (10x150mm, 5 μm) der Firma *Waters*. Die Fraktionierung erfolgte nach UV-Detektorsignal bei $\lambda = 260$ nm. Als mobile Phase wurde eine binäre Mischung aus A (0.1 M Triethylamoniumacetat, pH 7.5, aq.) und B (MeCN) und folgende Gradienten verwendet:

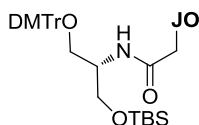
Gradient XII: 3% B bis 30% B in 30 min bei einer Flussrate von 20 mL/min (DMTon).

Gradient XIII: 3% B bis 15% B in 30 min, bei einer Flussrate von 20 mL/min (DMToff).

Die Analyse erfolgte analog zur vormals beschriebenen Prozedur mittels MALDI-TOF-MS sowie analytischer HPLC.

6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3

DMTr-L-Ser(JO)-OTBS (41)



Carboxymethyliertes JO (**40**, hergestellt nach Ref.^[190]) (0.40 g, 1.21 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 30 mL DMF suspendiert und mit PyBOP (0.30 g, 1.21 mmol), PPTS (0.63 g, 1.21 mmol, 1.0 Äq.) und NMM (0.53 mL, 4.84 mmol, 4.0 Äq.) versetzt. Das Serinolrückgrat (**13**) (0.61 g, 1.21 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL DMF gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit jeweils 50 mL EtOAc und ges. NaHCO₃-Lösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde über *Celite* filtriert, der Filterkuchen zweimal mit EtOAc gewaschen. Die vereinte organische Phase wurde zweimal mit ges. NaHCO₃-Lösung sowie einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt. (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH:Me₂NEt, 95.9:4:0.1, v/v/v).

Ausbeute: 0.61 g (55%, 0.67 mmol), lila, amorpher Feststoff.

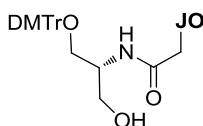
R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9/10/0.1, v/v/v) = 0.55.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 823.3886 (100%) [M]⁺ (ber. für C₄₉H₅₅N₄O₆Si⁺: 823.3885)

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 8.39 (bs, 1H, H1), 8.35 – 8.29 (m, 1H, H5), 7.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H11), 7.83 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H7), 7.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H2), 7.66 – 7.60 (m, 1H, H13), 7.57 – 7.49 (m, 2H, H12, DMTr), 7.41 – 7.37 (m, 2H, DMTr), 7.29 – 7.22 (m, 6H, DMTr), 7.21 – 7.14 (m, 2H, H6, H8), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NHCO), 6.85 – 6.79 (m, 4H, DMTr), 6.36 (s, 1H, H10), 4.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, CH₂CO), 4.17 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, N⁺-Me), 4.13 – 4.05 (m, 1H, CH), 3.76 – 3.72 (m, 7H, 2xOMe, ½CH₂), 3.66 (dd, *J* = 10.2, 6.1 Hz, 1H, ½CH₂), 3.16 (dd, *J* = 9.1, 5.9 Hz, 1H, ½CH₂), 3.09-3.08 (m, 1H, ½CH₂), 0.80 (s, 9H, Si-*t*Bu), -0.01 (s, 3H, Si-Me), -0.01 (s, 3H, Si-Me).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 173.5 (Cq), 166.5 (Cq), 159.7 (Cq), 146.2 (Cq), 143.8 (C2), 139.2 (Cq), 137.1 (Cq), 137.0 (Cq), 133.8 (C13), 131.0 (4xCH-DMTr), 129.0 (2xCH-DMTr), 128.8 (2xCH-DMTr), 127.8 (C6), 126.9 (CH-DMTr), 126.2 (C11), 124.4 (Cq), 119.3 (C7), 117.8 (C12), 117.2 (C8), 114.1 (2xCH-DMTr), 110.3 (C1), 86.9 (Cq-DMTr), 83.2 (C10), 62.8 (CH₂), 61.9 (CH₂), 57.1 (CH₂CO), 56.0 (2xOMe), 54.13, 52.5 (CH), 41.2 (N⁺-Me), 26.2 (Si-*t*Bu), -5.2 (Si-Me), -5.2 (Si-Me).

DMTr-L-Ser(JO)-OH (42)



Eine Lösung aus **41** (1.95 g, 2.16 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (50 mL) wurde mit TBAF·3H₂O (1.44 g, 4.32 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und für eine Stunde bei RT gerührt. Es wurden 100 ml

halbgesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung zugesetzt, für weitere 15 min gerührt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Der Feststoff wurde viermal mit je 20 mL Wasser, je zweimal mit 20 mL EtOAc sowie 20 mL Ether gewaschen und schließlich im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde dreimal mit Pyridin koevaporiert, um Reste von Wasser zu entfernen.

Ausbeute: 1.10 g (64%, 1.39 mmol), lila, amorpher Feststoff.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 709.3022 (100%) [M]⁺ (ber. für C₄₃H₄₁N₄O₆⁺: 709.3021)

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 8.36 (bs, 1H, H1), 8.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H11), 7.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H5), 7.82 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H7), 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H2), 7.61 – 7.57 (m, 1H, H13), 7.53 – 7.47 (m, 2H, H12, DMTr), 7.40 – 7.36 (m, 2H, DMTr), 7.28 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, DMTr), 7.26 – 7.22 (m, 4H, DMTr), 7.21 – 7.15 (m, 2H, H6, H8), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NHCO), 6.82 (dd, *J* = 9.0, 1.1 Hz, 4H, DMTr), 6.33 (s, 1H, H10), 4.96 (s, 2H, CH₂CO), 4.17 (s, 3H, N⁺-Me), 4.11 – 4.03 (m, 1H, CH), 3.74 (s, 6H, 2xOMe), 3.63 (dd, *J* = 10.9, 5.7 Hz, 1H, ½ CH₂), 3.59 (dd, *J* = 10.9, 5.4 Hz, 1H, ½ CH₂), 3.13 (dd, *J* = 9.3, 5.6 Hz, 1H, ½ CH₂), 3.09 – 3.07 (m, 1H, ½ CH₂).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 173.5 (Cq), 166.9 (Cq), 159.7 (Cq), 146.1 (Cq), 143.8 (C2), 139.2 (Cq), 137.1 (Cq), 137.0 (Cq), 136.3 (C5), 133.8 (C13), 131.0 (4xCH-DMTr), 129.1 (2xCH-DMTr), 128.9 (2xCH-DMTr), 127.9 (C6), 126.9 (CH-DMTr), 126.2 (C11), 124.5 (Cq), 119.3 (C7), 117.8 (C12), 117.2 (C8), 114.1 (4xCH-DMTr), 110.3 (C1), 87.0 (Cq-DMTr), 83.2 (C10), 63.3 (CH₂), 62.4 (CH₂), 57.1 (CH₂CO), 56.0 (2xOMe), 52.9 (CH), 41.2 (N⁺-Me).

Waschfreie Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Experimente wurden von Dr. Imre Gaspar am EMBL-Heidelberg durchgeführt. Dazu wurden vollständige Eikammern von *Drosophila melanogaster* in 4% *p*-Formaldehyd (aq.) innerhalb von 30 min fixiert. Zur Hybridisierung wurden die Eikammern für 3 min bei 92 °C in FITsh-Puffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.3% Tween-20, pH 7.7) inkubiert und danach 5 min auf Eis gekühlt. Die Eikammern wurden mit einer 0.2 µM (in FITsh-Puffer) der jeweiligen Sonden für 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Mikroskopie auf Objektträgern aufgebracht. Die Gesamtdauer der Prozedur betrug ca. 90 min. Für konventionelle FISH wurden DIG-markierte Oligonukleotide verwendet, welche komplementär zu den letzten 400 Nukleotiden der kodierenden Oskar-Sequenz waren. Diese Eikammern wurden bei 65 °C für eine Stunde in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 0.75 M NaCl, 75 mM Natriumcitrat, 50 µg/ml Heparin, 100 µg/ml Salmon-Sperm-DNA, 1% Tween-20, pH 7.0) inkubiert, anschließend mit Sonde versetzt (0.5 µg/mL) und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Überschüssige Sonden wurde durch Waschen entfernt und DIG mittels Antikörper detektiert. Dazu wurde die Eikammer mit Anti-DIG-Antikörpern, gebunden an Meerrettich-Peroxidase (Roche, 1:200 verdünnt in PBS + 0.1% Tween-20), für zwei Stunden inkubiert und überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt. Das Fluoreszenzsignal wurde durch ein HRP-TSA-OG488 Amplification Kit der Firma Invitrogen unter Verwendung des Herstellerprotokolls erzeugt. Die Gesamtdauer der Prozedur betrug ca. 18 h. Die Analyse der fixierten Eikammern erfolgte an einem SP8 TCS Mikroskop der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung eines 40x-1.1 NA Wasserimmersionsobjektivs. Die Farbstoffe

wurden durch die Wahl geeigneter Anregungsbereiche eines Lasers mit weißem Licht und 8 nm breiten Linien angeregt. Die Detektion erfolgte mittels eines Hybrid-Detektors mit 1 AU (*Airy Unit*) großer Lochblende für konfokale Mikroskopie sowie einem Photoelektronen-vervielfacher mit vollständig geöffneter Lochblende (7.7 AU) zur simulierten Weitfeldmikroskopie. Zur Detektion wurden folgenden Emissionsbereiche verwendet: OG488: $\lambda(\text{em}) = 510\text{--}610\text{ nm}$, TO, JO, TOJO: $\lambda(\text{em}) = 530\text{--}630\text{ nm}$.

Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.3

Tabelle 6.4.1: Analytische Daten der doppelt TO-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M-3H] ⁻	gefunden	
neu-TOTO-ab	GGTTTCXXTTATTATGCCGTTGTATTT	8616	8615	2.23
neu-TOTO-ac	GGTTTCXGXTATTATGCCGTTGTATTT	8641	8641	2.07
neu-TOTO-ad	GGTTTCXGTXATTATGCCGTTGTATTT	8641	8636	2.07
neu-TOTO-ae	GGTTTCXGTTXTTATGCCGTTGTATTT	8632	8634	2.04
neu-TOTO-af	GGTTTCXGTTAXTATGCCGTTGTATTT	8641	8644	2.13
neu-TOTO-ag	GGTTTCXGTTATXATGCCGTTGTATTT	8641	8640	2.12
neu-TOTO-ah	GGTTTCXGTTATTXTGCCGTTGTATTT	8632	8631	2.13
neu-TOTO-ai	GGTTTCXGTTATTAXGCCGTTGTATTT	8641	8642	1.90
neu-TOTO-aj	GGTTTCXGTTATTATXCCGTTGTATTT	8616	8618	1.98
neu-TOTO-ab	GGTTTCXGTTATTATGXCGTTGTATTT	8656	8650	2.12
neu-TOTO-ab	GGTTTCXGTTATTATGCXGTTGTATTT	8656	8660	1.91
neu-TOTO-am	GGTTTCXGTTATTATGCCXTTGTATTT	8616	8622	2.10
neu-TOTO-an	GGTTTCXGTTATTATGCCGXTGTATTT	8641	8643	2.09
neu-TOTO-ao	GGTTTCXGTTATTATGCCGTXGTATTT	8641	8643	2.11
neu-TOTO-ch	GGTTTCAGXTATTXTGCCGTTGTATTT	8641	8643	1.94
neu-TOTO-en	GGTTTCAGTTXTTATGCCGXTGTATTT	8641	8641	2.09
neu-TOTO-cn	GGTTTCAGXTATTATGCCGXTGTATTT	8650	8652	2.04

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische UPLC-RP-UV, Gradient VI.

Tabelle 6.4.2: Analytische Daten der JO-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(JO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
neu-JO-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	8446	8450	8.96
neu-JO-b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	8430	8432	8.86
neu-JO-c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	8455	8458	8.84
neu-JO-d	GGTTTCAGTXATTATGCCGTTGTATTT	8455	8457	8.81
neu-JO-e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	8446	8450	8.94
neu-JO-f	GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTATTT	8455	8457	8.84
neu-JO-g	GGTTTCAGTTATXATGCCGTTGTATTT	8455	8459	8.89
neu-JO-h	GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTATTT	8446	8450	8.90
neu-JO-i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTATTT	8455	8458	8.86
neu-JO-j	GGTTTCAGTTATTATXCCGTTGTATTT	8430	8434	8.89
neu-JO-k	GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTATTT	8470	8473	8.78
neu-JO-l	GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTATTT	8470	8458	8.85
neu-JO-m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	8430	8433	8.91
neu-JO-n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXTGTATTT	8455	8458	8.67
neu-JO-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXGTATTT	8455	8457	8.70

[a] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

Tabelle 6.4.3: Analytische Daten der TOJO-markierten Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO), Y = Ser(JO)	MALDI-TOF-MS ^a	R _T / min ^b
------	--	---------------------------	-----------------------------------

6. Experimenteller Teil

		ber. [M-H] ⁺	gefunden	
neu-TOJO-eb	GGTTTCAYTTATTATGCCXTTGTATTT	8586	8582	9.35
neu-TOJO-ch	GGTTTCAYTTXTTATGCCGTTGTATTT	8602	8597	9.16
neu-TOJO-ej	GGTTTCAGXTATTYTGCCGTTGTATTT	8627	8623	8.94
neu-TOJO-nh	GGTTTCAGXTATTATYCCGTTGTATTT	8611	8606	9.28
neu-TOJO-cj	GGTTTCAGTTYTTATGCCXTTGTATTT	8602	8598	8.90
neu-TOJO-me	GGTTTCAGTTYTTATGCCGXGTATTT	8627	8624	9.25
neu-TOJO-ne	GGTTTCAGTTXTTATYCCGTTGTATTT	8602	8598	9.20
neu-TOJO-mb	GGTTTCAGTTATTYTGCCGXGTATTT	8627	8624	9.15

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

Tabelle 6.4.4: Analytische Daten der TO-, JO- und TOJO-markierten Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz, X = TO, Y = JO	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^d
		ber.	gefunden	
osk-TO-a	CTCGXTTCAATAACTTGCAGT	6552 ^b	6551	9.35
osk-TO-b	CTCGTTTCAXTAACCTTGCAGT	6543 ^b	6542	9.06
osk-TO-c	CTCGTTTCAATAACXTGCAGT	6552 ^b	6551	9.03
osk-JO-a	CTCGYTTCAATAACTTGCAGT	6533 ^b	6535	8.88
osk-JO-b	CTCGTTTCAYTAACCTTGCAGT	6524 ^b	6526	8.81
osk-JO-c	CTCGTTTCAATAACYTGCAGT	6533 ^b	6534	8.67
osk-TOJO-ac	CTCGXTTCAATAACYTGCAGT	6851 ^c	6852	8.78
osk-TOJO-ca	CTCGYTTCAATAACXTGCAGT	6851 ^c	6852	8.94

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix [b] berechnet für [M]⁺; [c] berechnet für [M-H]⁺;

[d] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

6.5 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.4

DNase-I-Verdau

Die Fluoreszenzemission der Sonde bzw. des Sonden-RNA-Duplex wurde während der Inkubation mit RNase-freier DNase-I bei 37 °C in TRIS-Puffer (40 mM TRIS, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) aufgezeichnet. Die Abnahme der Fluoreszenz korreliert dabei mit dem Verdau der Sonde. Zu 1 mL Puffer (0-3 min) wurden 100 pmol der jeweiligen Sonde (3-6 min) sowie 140 pmol komplementärer RNA (1.4 Äq.) gegeben (6-12 min). Danach wurden 40 Einheiten (u) DNase-I zugegeben (0.4 u pro pmol Sonde) und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von mindestens zehn Stunden aufgezeichnet; $\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

RNase-H-Verdau

Die Fluoreszenzemission der Sonde bzw. des Sonde-RNA-Duplex wurde während der Inkubation mit RNase-H bei 37 °C in TRIS-Puffer (40 mM TRIS, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) aufgezeichnet. Die Abnahme der Fluoreszenz korreliert dabei mit dem Verdau der Ziel-RNA. Zu 150 μL Puffer (0-3 min) wurden 15 pmol der jeweiligen Sonde (3-6 min) sowie 20 pmol komplementärer RNA (1.3 Äq.) gegeben (6-14 min). Danach wurden 5 Einheiten (u) RNase-H zugegeben (0.33 u pro pmol Sonde) und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden aufgezeichnet; $\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm.

Mikroinjektion und Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Oozyten von *Drosophila melanogaster*

Die Arbeiten zur Injektion der Sonden, Fluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse wurden von Dr. Imre Gaspar (EMBL-Heidelberg) durchgeführt. Wildtyp(*w¹¹¹⁸*)-, *oskMS2*-GFP- und *oskMS2*-mCherry *Drosophila melanogaster* wurden über Nacht vor dem Experiment unter Proteinreicher Diät gehalten. Die Ovarien wurden in BR80 (80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 6.9) geteilt und in einen Tropfen S2-Kulturmedium (*Invitrogen*, Carlsbad, USA) (+10% FCS und 200 $\mu\text{g/mL}$ Insulin) überführt. Ovariolen mit Stufe 9-Eikammern wurden separiert und unter der Mikropipette ausgerichtet. Die Präparation wurde mit *Voltalef 10S-Öl* (*VWR-International*, Radnor, USA) überschichtet um Austrocknung zu vermeiden. Die jeweilige Sonde bzw. Mischung wurde mit Injektions-Puffer (IB, 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1mM MgCl₂, pH 7.7) sowie BSA (*Bovine Serum Albumin*, 0.5 mg/mL Endkonzentration) versetzt, um die Mischung in der Mikropipette zu stabilisieren. Die Mikropipetten (Eigenanfertigung des EMBL-Heidelberg) wurden mit der Sondenmischung beladen und ca. 1-4% des gesamten Oozytenvolumens durch einen FemtoJet-Injektor (*Eppendorf*, Hamburg, Deutschland) in die Oozyten injiziert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem *Leica TCS SP8* Konfokalmikroskop. Zur Analyse der optischen Eigenschaften der RNPs wurde eine Aufnahme (41.01 $\mu\text{m} \times 25.58 \mu\text{m}$) ca. 15 min nach der Injektion angefertigt. Zur Verfolgung der RNPs wurden kontinuierlich Bilder aufgenommen (41.01 $\mu\text{m} \times 25.58 \mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m} \times 62 \text{ s}$,

1.6 fps). Alle Aufnahmen erfolgten mit der *LASAF Acquisition Software* unter Verwendung eines 63×1.2 NA-Wasserimmersionsobjektiv. Die computergestützte Verfolgung und Analyse der *Oskar*-RNPs erfolgte durch ein *ImageJ Plug-in*, welcher von Ghosh *et al.* entwickelt wurde.^[223] Die statistische Analyse und graphische Ausgabe wurde mittels „R3.0.2“ (R. C. Team, *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012) unter Verwendung der Software „Rstudio 0.98“ und der „ggplot2 R library“ (<http://ggplot2.org/>) durchgeführt.

Analytische Daten der Sonden für Kapitel 4.4

Tabelle 6.5.1: Analytische Daten der DNA- und LNA-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz ^a , X =Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden.	
neu2a	CAGTT X TATGCCGTTG	5363	5363	9.6
neu2b	CAGTTA X TATGCCGTTG	5372	5373	9.1
neu2c	CAGTTAT X ATGCCGTTG	5372	5372	9.4
neu2d	CAGTTATT X TGCCGTTG	5363	5363	9.5
neu2e	CAGTTATT X AGCCGTTG	5372	5372	9.1
neu2f	CAGTTATTAT X CCGTTG	5347	5348	9.1
neu2g	CAGTTATTATG X CGTTG	5387	5389	9.0
neu2h	CAGTTATTATGC X GTTG	5387	5388	9.1
neu2La	CAGTT X LATGCCGTTG	5391	5391	9.5
neu2Lb	CAGTTA X LATGCCGTTG	5400	5400	9.5
neu2Lc	CAGTTAT X ALGCCGTTG	5400	5400	9.4
neu2Ld	CAGTTATT X LGCCGTTG	5391	5392	9.5
neu2Le	CAGTTATT X GLCCGTTG	5400	5401	9.2
neu2Lf	CAGTTATTAT X CLCGTTG	5389	5390	9.0
neu2Lg	CAGTTATTATG X CLGTTG	5429	5431	9.1
neu2Lh	CAGTTATTATGC X GLTTG	5415	5416	9.3

[a] Tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

Tabelle 6.5.2: Analytische Daten der TO-markierten DNA-Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min
		ber. [M] ⁺	gefunden.	
osk1-1	GACTT X AGATAATAGGTTTTGGCG	7618	7621	9.5 ^b
osk1-2	GACTTAAGATA X TAGGTTTTGGCG	7618	7620	9.6 ^b
osk1-3	GACTTAAGATAATAGGT X TTGGCG	7627	7629	9.5 ^b
osk1-4	GACTTAAGATAATAGGTT X TGGCG	7627	7628	9.5 ^b
osk2-1	AAAAGC X GAAAAGTTGAAGAGAA	7671	7690	14.2 ^c
osk2-2	AAAAGCGGA X AGTTTGAAGAGAA	7687	7688	14.2 ^c
osk2-3	AAAAGCGGA X AGTTTGAAGAGAA	7696	7697	14.4 ^c
osk2-4	AAAAGCGGA X AGTTTGAAGAGAA	7696	7698	14.3 ^c
osk3-1	CTCG X TTCAATAACTTGCAGT	6552	6551	9.8 ^b
osk3-2	CTCGTTTC X TAACCTTGCAGT	6543	6542	9.5 ^b
osk3-3	CTCGTTTC X TAACCTTGCAGT	6567	6566	9.6 ^b
osk3-4	CTCGTTTC X TAACCTTGCAGT	6552	6551	9.4 ^b
osk4-1	ACCG X TTTTGTTCCAGAAC	5934	5936	9.6 ^b
osk4-2	ACCGAT X TTGTTCCAGAAC	5943	5945	9.6 ^b
osk4-3	ACCGATTTT X TCCAGAAC	5918	5920	9.3 ^b
osk4-4	ACCGATTTTGTTC X GAAC	5934	5936	9.4 ^b
osk5-1	CGGT X TTCTGGCTTTGGGT	6028	6030	9.3 ^b
osk5-2	CGGTTTT X TGGCTTTGGGT	6043	6045	9.5 ^b
osk5-3	CGGTTTTCTGG X TTTGGGT	6043	6045	9.4 ^b

6.5. Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.4

osk5-4	CGGTTTTCTGGCTXTGGGT	6028	6029	9.4 ^b
osk6-1	GTCXGTTTTCGATATTCAC	5940	5942	9.5 ^b
osk6-2	GTCAGXTTTCGATATTCAC	5949	5951	9.4 ^b
osk6-3	GTCAGXTTTCGATATTCAC	5949	5951	9.6 ^b
osk6-4	GTCAGTTTTCGXTATTCAC	5940	5942	9.5 ^b

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient IX.

Tabelle 6.5.3: Analytische Daten der TO-markierten LNA- und 2'-O-Me-Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
osk1-2b	<u>T</u> _L AAG _L ATAXT _L AGGT _L T-idT	4911	4913	10.1
osk1-2c	<u>GACTTAAGATAXTAGGTTTTGGCG</u>	8499	8497	11.7
osk2-3b	<u>G</u> _L CGG _L AAAAGXT _L TGAAG _L -idT	5589	5591	9.6
osk2-3c	<u>AAAAGCGGAAAAGXTTGAAGAGAA</u>	8661	8661	11.8
osk3-1b	<u>C</u> _L TCGXT _L TCAAT _L A-idT	4176	4177	10.5
osk3-1c	<u>CTCGXTTCAATAACTTGCAGT</u>	7356	7354	12.1

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide, idT = inverses dT; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

Tabelle 6.5.4: Analytische Daten der LNA- und 2'-O-Me-Sonden zur Optimierung der Nukleaseresistenz.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
osk1e	<u>TTAAGATAXTAGGTTTTGG</u>	6632	6632	11.5
osk1f	<u>TTAAGATAXTAGGTTTTGG</u>	6586	6586	11.5
osk1g	<u>TTAAGATAXT_LAGGTTTTGG</u>	6644	6645	11.8
osk1h	<u>TTAAGATAXT_LAGGTTTTGG</u>	6614	6615	11.8

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.5.5: Analytische Daten der 1-Nt-Abstand Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
osk1	<u>TTAAGATAXT_LAGGTTTTGG</u>	6584	6585	11.6
osk2	<u>GCGGAAAAGXT_LTGAAGAGA</u>	6743	6744	11.4
osk3	<u>CTCGXT_LTCAATAACTTGCA</u>	6478	6476	12.1
osk3b	<u>CTCGTTTCAATAA_CXT_LGCA</u>	6464	6464	9.7
osk4	<u>ACCGATXT_LTGTTCCAGAAC</u>	6532	6532	10.8
osk5	<u>CGGTTTTCTGGXT_LTGGGT</u>	6561	6541	9.4
osk6	<u>GTCAGXT_LTTCGATATTCAC</u>	6495	6494	10.6

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.5.6: Analytische Daten der JO-, TOTO- und TOJO-*Oskar*-Sonden mit ohne LNA.

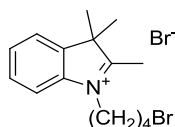
Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO), Y = Ser(JO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
osk6-2L(TO)	GTCAGXT _L TTCGATATTCAC	5977	5978	9.5
osk6-2-4(TOTO)	GTCAGXTTTCGXTATTCAC	6119	6120	9.5
osk6-2L-4L(TOTO)	GTCAGXT _L TTCGXT _L ATTCAC	6175	6176	9.6
osk6-2(TO)-4(JO)	GTCAGXTTTCGYTATTCAC	6103	6104	9.3
osk6-4(JO)	GTCAGTTTTCGYTATTCAC	5924	5925	9.3
osk6-4L(JO)	GTCAGTTTTCGYT _L ATTCAC	5952	5953	9.2
osk6-2L(TO)-4(JO)	GTCAGXT _L TTCGYTATTCAC	6131	6132	9.5
osk6-2L(TO)-4L(JO)	GTCAGXT _L TTCGYT _L ATTCAC	6159	6160	9.4

6. Experimenteller Teil

[a] Tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix;
[c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

6.6 Experimentelle Daten Kapitel 4.5

1-(4-Bromobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-iumbromid (45)



2,2,3-Trimethylindol (44) (5.0 mL, 5.0 g, 31.6 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 7 mL MeCN wurden mit 1,4-Dibrombutan (15.0 mL, 27.1 g, 125.6 mmol, 4.0 Äq.) versetzt und 24 h auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen der violetten Mischung auf RT wurden 80 mL Et₂O zugesetzt. Der Überstand wurde verworfen, der verbleibende Feststoff in MeOH aufgelöst und erneut durch die Zugabe von Et₂O ausgefällt. Der grau-violette Feststoff wurde filtriert, zweimal mit Et₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.92 g (13.12 mmol, 42%) grau-violetter, amorpher Feststoff.

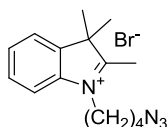
R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v) = 0.75.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 294.0851 (100%), 296.0835 (97%) [M]⁺ (ber. für C₁₅H₂₁NBr⁺: 294.0857, 296.0837).

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.15 – 6.99 (m, 2H), 6.74 – 6.57 (m, 2H), 3.51 (q, *J* = 6.8 Hz, 4H), 1.91 (s, 3H), 1.85 (dt, *J* = 14.8, 6.7 Hz, 2H), 1.77 – 1.59 (m, 2H), 1.25 (s, 6H).

¹³C-NMR: (75 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 160.5 (C_q), 145.5 (C_q), 136.9 (C_q), 127.5 (CH_{arom}), 121.8 (CH_{arom}), 118.2 (CH_{arom}), 105.3 (CH_{arom}), 43.8 (C_q), 40.6 (CH₂), 34.7 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (2xCH₃), 24.4 (CH₂), 21.1 (CH₃).

1-(4-Azidobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-iumbromid (46)



Zum Alkylimidazoliumbromid 45 (500 mg, 1.33 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 6 mL DMF, wurde Natriumazid (260 mg, 3.99 mmol, 3.0 Äq.) zugesetzt und für 4 h auf 90 °C erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand in 15 mL CH₂Cl₂ aufgenommen, die organische Phase dreimal mit je 10 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v).

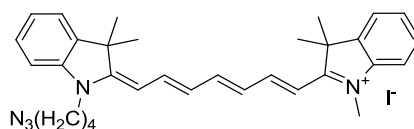
Ausbeute: 360 mg (1.07 mmol, 80%) grau-violetter, amorpher Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v) = 0.73.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 257.1761 (100%) [M]⁺ (ber. für C₁₅H₂₁N₄⁺: 257.1761).

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.19 – 6.99 (2H, m), 6.86 – 6.71 (1H, m), 6.55 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 3.56 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 3.32 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂), 1.84 – 1.57 (4H, m, 2xCH₂), 1.38 – 1.32 (9H, 3xCH₃).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 161.6 (C_q), 145.9 (C_q), 137.6 (C_q), 127.6 (C_{aryl}), 122.0 (C_{aryl}), 118.5 (C_{aryl}), 105.1 (C_{aryl}), 51.4 (CH₂), 44.3 (C_q), 41.8 (CH₂), 30.2 (2xCH₃), 26.8 (CH₂), 23.7 (CH₂), 23.2 (CH₃).

Cyanin-7-azid (50)

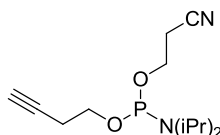
1-(4-Azidobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-iumbromid (**46**) (360 mg, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) und Hemicyanin **48** (hergestellt nach Ref.^[271]) (562 mg, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 8 mL Pyridin gelöst und 1 h bei 50 °C gerührt, wobei ein Farbumschlag von rotbraun nach grünblau zu beobachten war. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch gereinigt (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, v/v). Die Produktfraktionen wurden vereint, in *tert*-Butanol/MeCN (9:1, v/v) gelöst und lyophyllisiert. *Ausbeute*: 350 mg (0.57 mmol, 57%) grün-blauer, amorpher Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v) = 0.59.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 492.3123 (100%) [M]⁺ (ber. für C₃₂H₃₈N₅⁺: 492.3122).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 7.83 (dt, J = 18.9, 13.2 Hz, 2H, Cy-H2, Cy-CH6), 7.66 (bs, 1H, Cy-H4), 7.46 (dd, J = 10.2, 7.4 Hz, 2H, H_{aryl}), 7.38 (dt, J = 14.4, 3.9 Hz, 2H, H_{aryl}), 7.26 – 7.15 (m, 4H, H_{aryl}), 6.53 (t, J = 12.3 Hz, 2H, Cy-H3, Cy-H5), 6.26 (d, J = 13.7 Hz, 2H, Cy-H1, Cy-H7), 4.02 (t, J = 7.4 Hz, 2H, N-CH₂), 3.55 (s, 3H, N-CH₃), 3.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H, N₃-CH₂), 1.85 – 1.77 (m, 2H, CH₂), 1.75 – 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.64 (s, 6H, 2xCH₃), 1.64 (s, 6H, 2xCH₃).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 172.58 (C_q), 152.59 (CH), 151.76 (CH), 144.10 (C_q), 143.49 (C_q), 142.23 (C_q), 142.09 (C_q), 129.51 (C_{aryl}), 129.46 (C_{aryl}), 126.28 (CH), 125.95 (C_{aryl}), 125.68 (CH), 125.49 (C_{aryl}), 123.23 (C_{aryl}), 123.14 (C_{aryl}), 111.84 (C_{aryl}), 111.54 (C_{aryl}), 105.13 (CH), 104.14 (CH), 51.72 (CH₂), 50.08 (C_qMe₂), 49.82 (C_qMe₂), 44.39 (CH₂), 32.30 (N-CH₃), 27.97 (2xCH₃), 27.70 (2xCH₃), 26.79 (CH₂), 25.30 (CH₂).

Phosphitylierung von 3-Butin-1-ol (51)

Unter Argonatmosphäre wurde 3-Butin-1-ol (35 mg, 0.50 mmol, 40 μ L, 1.0 Äq.) und NEt₃ (126 mg, 1.25 mmol, 174 μ L, 2.5 Äq.) in 3 mL CHCl₃ vorgelegt und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (178 mg, 0.75 mmol, 167 μ L, 1.5 Äq.) zugegeben. Es wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend die gesamte Reaktionsmischung flashchromatographisch mittels Argondruck an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: cHex/Pyridin, 9/1, v/v). Das gereinigte Produkt erwies sich als lagerstabil für mindestens zwölf Monate.

Ausbeute: 128 mg (95%, 0.48 mmol), farbloses Öl.

R_f (cHex/CH₂Cl₂/NEt₃, 5:4:1, v/v/v) = 0.62.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.91 – 3.54 (m, 6H, 2O-CH₂, 2N-CH), 2.65 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH₂-CN), 2.50 (dt, 2H, J_1 = 2.6 Hz, J_2 = 6.9 Hz, C_q-CH₂), 1.97 (t, 1H, J = 2.7 Hz, CH \equiv C_q), 1.18 (dd, 12H, J_1 = 1.9 Hz, J_2 = 6.8 Hz, 4CH₃).

^{13}C -NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 69.7 ($\text{C}_q\text{-CH}$), 61.8 (CH_3), 61.6 (CH_3), 58.8 (CH_3), 58.5 (CH_3), 43.3 (O-CH_2), 43.1 ($\text{O-CH}_2'$), 24.8 - 24.6 (m, $\text{C}_q\text{-CH}_2'$, $\text{CH}_2\text{-CN}$), 21.5 (d, $J = 7.2$ Hz, N-CH), 20.5 (d, $J = 6.5$ Hz, N-CH).

^{31}P -NMR (121 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 148.7 (PIII).

Click-Reaktion und Reinigung terminal-markierter FIT-Sonden

Die Butin-1-ol-modifizierten FIT-Sonden (100 μM) wurden in PUS-Puffer (100 mM TRIS, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl_2 , pH 8) und Ascorbinsäure (7.5 mM), THPTA als Kupfer-Ligand (3.75 mM) und Cy7-Azid (**50**) (500 μM , aus Stocklösung in DMSO) zugegeben. Anschließend wurde Kupfer(II)sulfat (0.75 mM) zugeben und die Mischung für 3 h bei 55 °C inkubiert. Alle Angaben sind Endkonzentrationen der Reaktionsmischung. Die Sonden wurden durch Zugabe von Isopropanol (3 Äq.-Vol.) und Zentrifugation (14000 rpm, 10 min) gefällt. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand zweimal mit Isopropanol gewaschen und schließlich in Wasser gelöst, mittels Spritzenfilter und unlöslichen Bestandteilen entfernt und per HPLC-RP-UV/Vis gereinigt.

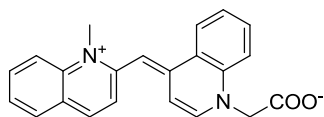
Analytische Daten zu Kapitel 4.5

Tabelle 6.6.1: Analytische Daten der Cy7-markierten FIT-Sonden zur Detektion von *Oskar*-mRNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R_T / min ^c
		ber. $[\text{M-H}]^+$	gefunden	
osk-a-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTT X AGATAATAGGTTTTGGCG	8242	8245	10.61
osk-b-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTTAAGATA X TAGGTTTTGGCG	8242	8244	10.8
osk-c-Bu-Cy7	Cy7-Bu-GACTTAAGATAATAGG T TTGGCG	8251	8253	10.77
osk-d-Bu-Cy7	Cy7-Bu-CGGTTTTCTGG X TTTGGGT	6668	6664	11.31
osk-dL-Bu-Cy7	Cy7-Bu-CGGTTTTCTGG X _L TTGGGT	6696	6892	10.99
osk-e-Bu-Cy7	Cy7-Bu-AAAAGCGGAAAAG X TTGAAGA	7365	7360	10.92
osk-eL-Bu-Cy7	Cy7-Bu-AAAAGCGGAAAAG X _L TGAAGA	7393	7389	10.95

[a] Tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient XI.

6.7 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.6

N-Carboxymethyliertes Chinolinviolett (57)

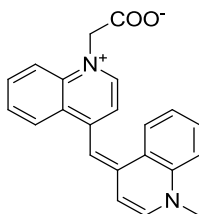
N-Methyl-2-chlorchinoliniumiodid (**62**, hergestellt nach Ref.^{[168]) (250 mg, 820 μ mol, 1.0 Äq.) und *N*-Carboxymethyllepidiniumbromid (280 mg, 984 μ mol, 1.2 Äq.) wurden in 2 mL CH₂Cl₂ suspendiert, mit 400 μ L NEt₃ (2886 μ mol, 3.5 Äq.) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der violette Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH: 8/2, v,v).}

Ausbeute: 26%, 73 mg, 213 μ mol, violetter Feststoff

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 343.1441 [M+H]⁺ (100%) (ber. für C₂₂H₁₉N₂O₂⁺: 343.447), 365.1260 [M+Na]⁺ (50%) (ber. für C₂₂H₁₈N₂O₂Na⁺: 365.1260).

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.53 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.23 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 8.12 – 8.04 (3H, m), 7.98 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.89 – 7.80 (2H, m), 7.69 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.63 – 7.55 (2H, m), 7.34 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.59 (1H, s, Methin), 5.33 (2H, s, CH₂), 4.10 (2H, s, CH₃).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 169.1 (C_q), 155.1 (C_q), 148.7 (C_q), 143.0 (CH_{arom}), 140.5 (C_q), 140.0 (C_q), 138.3 (CH_{arom}), 132.8 (CH_{arom}), 129.1 (CH_{arom}), 125.9 (CH_{arom}), 125.6 (CH_{arom}), 125.0 (C_q), 123.9 (C_q), 121.8 (CH_{arom}), 117.2 (CH_{arom}), 117.2 (CH_{arom}), 107.5 (CH_{arom}), 95.7 (CH), 53.9 (CH₂), 39.5 (CH₃).

N-Carboxymethyliertes Chinolinblau (58)

N-Methyl-4-chlorchinoliniumiodid (**63**, hergestellt nach Ref.^{[168]) (250 mg, 820 μ mol, 1.0 Äq.) und *N*-Carboxymethyllepidiniumbromid (280 mg, 984 μ mol, 1.2 Äq.) wurden in 20 mL CH₂Cl₂ suspendiert, mit 400 μ L NEt₃ (2886 μ mol, 3.5 Äq.) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile in Vakuum entfernt und der blaue Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH: 8/2, v,v). Die Produktfraktionen wurden vereint, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der erhaltene blaue Feststoff aus Wasser umkristallisiert.}

Ausbeute: 77%, 216 mg, 631 μ mol, blauer Feststoff.

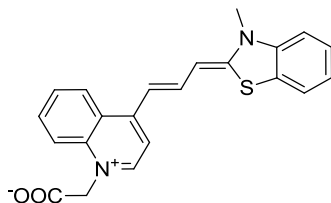
m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 343.1441 [M+H]⁺ (100%) (ber. für C₂₂H₁₉N₂O₂⁺: 343.447), 365.1260 [M+Na]⁺ (55%) (ber. für C₂₂H₁₈N₂O₂Na⁺: 365.1260).

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.71 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.64 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.0 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.98 – 7.92 (2H, m), 7.81 (1H, ddd, *J* = 8.5, 7.0,

1.3 Hz), 7.74 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.70 (1H, ddd, $J = 8.3, 5.9, 2.2$ Hz), 7.66 – 7.62 (1H, m), 7.57 (2H, dd, $J = 11.4, 4.1$ Hz), 7.27 (s, 1H, Methin), 5.23 (s, 2H, CH₂), 4.11 (s, 3H, Me).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ 169.0 (C_q), 149.9 (C_q), 148.2 (C_q), 144.1 (CH_{arom}), 143.0 (CH_{arom}), 138.6 (C_q), 138.4 (C_q), 133.0 (CH_{arom}), 132.5 (CH_{arom}), 126.6 (CH_{arom}), 125.9 (CH_{arom}), 125.8 (CH_{arom}), 125.7 (CH_{arom}), 125.4 (C_q), 124.7 (C_q), 117.9 (CH_{arom}), 117.1 (CH_{arom}), 109.8 (CH_{arom}), 107.7 (CH_{arom}), 96.9 (CH), 54.6 (CH₂), 42.1 (CH₃)

N-Carboxymethyliertes Thiazolrot (59)



Carboxymethyliertes Lepidin (7) (1.52 mg, 5.36 mmol, 1.0 Äq.) und Hemicyanin **65** (hergestellt nach Ref.^[182]) (2.34 g, 5.36 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 100 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit NEt₃ (7.6 mL, 54.3 mmol, 10 Äq.) versetzt. Die intensiv blau gefärbte Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Der entstandene blaue Feststoff wurde filtriert, zweimal mit je 20 mL CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

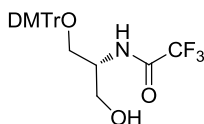
Ausbeute: 1.68 g (84%, 4.50 mmol), blauer Feststoff.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 375.1161 (100%) [M+H]⁺ (ber. für C₂₂H₁₉O₂N₂S⁺: 375.1162).

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.38 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 8.24 – 8.15 (2H, m, Methin), 7.90 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.88 – 7.80 (1H, m), 7.76 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.62 (2H, t*, $J_{app} = 8.8$ Hz, Chinolin-CH), 7.53 – 7.44 (1H, m), 7.36 – 7.29 (1H, m), 7.07 (1H, d, $J = 13.1$ Hz, Methin), 6.59 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, CH-Methin), 5.37 (2H, s, CH₂), 3.77 (3H, s, CH₃).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 168.8 (CO₂H), 144.6 (CH), 142.5 (CH), 141.9 (C_q), 138.7 (C_q), 133.2 (CH), 128.6 (CH), 127.8 (CH), 126.4 (CH), 125.0 (C_q), 124.9 (CH), 124.6 (CH), 122.7 (CH), 118.8 (C_q), 117.4 (CH), 116.5 (C_q), 114 (C_q), 113.0 (CH), 109.3 (CH), 108.9 (CH), 100.4 (CH), 54.3 (CH₂), 33.2 (CH₃).

DMTr-Ser(TFA) (66)



Eine Lösung aus **12** (8.50 g, 21.60 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL CH₂Cl₂ wurde mit NEt₃ (3.05 mL, 21.60 mmol, 1.0 Äq.) sowie Trifluoressigsäureethylester (2.82 mL, 25.92 mmol, 1.2 Äq.) versetzt und bei RT gerührt. Nach drei Stunden wurde Reaktionsmischung mit 100 mL CH₂Cl₂ verdünnt, dreimal mit je 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: cHex/EtOAc/NEt₃, 1:1:0.01, v/v/v).

Ausbeute: 8.00 g (16.35 mmol, 76%), gelbes Öl.

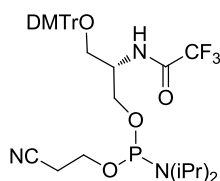
R_f (cHex/EtOAc/NEt₃, 1:1:0.01, v/v/v) = 0.63.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 512.1654 (100%), (ber. für C₂₆H₂₆F₃NNaO₅⁺ [M+Na]⁺ 512.1655).

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.32 – 7.28 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.24 – 7.13 (m, 7H, CH_{aryl}), 6.82 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 6.76 (dd, J = 8.9, 1.1 Hz, 4H, CH_{aryl}), 4.08 – 3.97 (m, 1H, CH), 3.80 (dd, J = 11.5, 3.8 Hz, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂ODMTr), 3.74 – 3.68 (m, 6H, 2xDMTr-OMe), 3.65 (dd, J = 11.5, 4.6 Hz, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂-ODMTr), 3.36 – 3.27 (m, 2H, CH₂OH), 2.11 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 158.9 (2xC_q-OMe), 158.7 (C_q, C=O), 144.3 (1xC_q), 135.4 (2xC_q), 130.1 (4xC_{aryl}), 128.2 (2xC_{aryl}), 128.0 (2xC_{aryl}), 127.3 (1xC_{aryl}), 113.5 (4xC_{aryl}), 113.4 (CO-CF₃) 87.0 (DMTr-C_q), 62.8 (CH₂ODMTr), 62.6 (CH₂OH), 55.4 (2xDMTr-OMe), 51.4 (CH).

DMTr-Ser(TFA)-Phosphoramidit (67)



Unter Argonatmosphäre wurde **66** (489.5 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL CH₂Cl₂ gelöst, mit Et₃NiPr₂ (680 μ L, 4.0 mmol, 4.0 Äq.) sowie 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorophosphoramidit (446 μ L, 2.0 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und 30 min bei RT gelöst. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: cHex/EtOAc/Pyridin, 2:1:0.01, v/v/v).

Ausbeute: 503 mg (0.73 mmol, 73%), farbloses Öl.

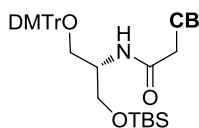
R_f (cHex/EtOAc/Pyridin, 2:1:0.01, v/v/v) = 0.62.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.49 – 7.41 (m, 2H, DMTr), 7.39 – 7.20 (m, 8H, DMTr), 6.91 – 6.85 (m, 4H, DMTr), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 4.42 – 4.25 (m, 1H, CH), 4.01 – 3.84 (m, 2H, CH₂-ODMTr), 3.81 (s, 6H, 2xDMTr-OMe), 3.81 – 3.66 (m, 3H, CH₂, $\frac{1}{2}$ xCH₂), 3.58 (ddd, J = 13.3, 10.4, 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.49 – 3.36 (m, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.34 – 3.20 (m, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.63 – 2.51 (m, 2H, CH₂-CN), 1.26 – 1.11 (m, 12H, 4xCH₃(NiPr₂)).

¹⁹F-NMR: (282 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = -76.10, -76.15 (CF₃, zwei Diastereomere).

³¹P-NMR: (121 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 149.47, 149.45 (P(III), zwei Diastereomere).

DMTr-Ser(CB)-OTBS (72)



N-Carboxymethyliertes CB (**58**) (1.21 g, 3.55 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 50 mL DMF suspendiert und mit PyBOP (2.23 g, 4.29 mmol, 1.2 Äq.), PPTS (0.90 g, 3.55 mmol, 1.0 Äq.) sowie NMM (1.54 mL, 1.42 g, 14.01 mmol, 4.0 Äq.) versetzt. Das Serinolrückgrat (**13**) (1.80 g, 3.55 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL DMF gelöst, zur Reaktionsmischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit jeweils 50 mL EtOAc und ges. NaHCO₃-Lösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde über *Celite* filtriert, der Filterkuchen zweimal mit EtOAc gewaschen und die vereinte organische Phase

zweimal mit ges. NaHCO₃-Lösung sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt. (Laufmittel: CH₂Cl₂:MeOH:Me₂NEt, 95.9:4:0.1, v/v/v).

Ausbeute: 2.35 g (72%, 2.57 mmol), blauer, amorpher Feststoff.

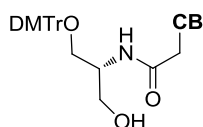
R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 89.9/10/0.1, v/v/v) = 0.58.

m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 832.4131 (100%) [M]⁺ (ber. für C₅₂H₅₈N₃O₅Si⁺: 832.4140).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN, zwei Rotamere) δ [ppm] = 8.44 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H_{Aryl}), 8.38 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H_{Aryl}), 7.94 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H_{Aryl}), 7.89 (1H, ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.3 Hz, H_{Aryl}), 7.84 – 7.79 (1H, m, H_{Aryl}), 7.66 – 7.60 (2H, m, H_{Aryl}), 7.60 – 7.55 (2H, m, H_{Aryl}), 7.49 – 7.44 (1H, m, H_{Aryl}), 7.44 – 7.37 (4H, m, H_{Aryl}), 7.29 – 7.18 (m, 7H, CH-DMTr), 7.09 (1H, s, CH-Methin), 6.88 – 6.78 (5H, m, 4xCH-DMTr, NH), 4.87 (2H, d, *J* = 0.9 Hz, CH₂-CO), 4.13 – 4.05 (1H, m, CH-NH), 4.00 (3H, s, CH₃), 3.80 – 3.71 (m, 7H, 2xOMe, ½ CH₂), 3.65 (1H, dd, *J* = 10.2, 6.0 Hz, ½ CH₂), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.1, 5.8 Hz, ½ CH₂), 3.09 – 3.02 (1H, m, ½ CH₂), 0.80 (9H, s, Si-*t*Bu), -0.01 (6H, d, *J* = 4.4 Hz, 2xSi-Me).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 166.6 (C_q), 159.6 (C_q), 152.1 (C_q), 149.3 (C_q), 146.2 (C_q), 144.9 (CH_{Aryl}), 143.5 (CH_{Aryl}), 139.9 (C_q), 139.5 (C_q), 137.1 (C_q), 136.9 (C_q), 134.1 (CH_{Aryl}), 133.5 (CH_{Aryl}), 131.0 (CH_{Aryl}), 131.0 (CH_{Aryl}), 128.9 (CH_{Aryl}), 128.8 (CH_{Aryl}), 127.8 (CH_{Aryl}), 127.7 (CH_{Aryl}), 126.8 (C_q), 126.7 (CH_{Aryl}), 126.7 (CH_{Aryl}), 126.6 (CH_{Aryl}), 125.9 (C_q), 118.6 (CH_{Aryl}), 117.5 (CH_{Aryl}), 114.0 (CH_{Aryl}), 114.0 (CH_{Aryl}), 111.4 (CH_{Aryl}), 108.6 (CH_{Aryl}), 98.8 (CH-Methin), 86.8 (CH_q), 62.7 (2xCH₂), 56.8 (CH₂CO), 55.9 (2xOMe), 52.4 (CH), 43.3 (N-CH₃), 26.8 (C_q Si-*t*Bu), 26.2 (Si-*t*Bu), -5.2, -5.3 (2xSi-Me).

DMTr-L-Ser(CB)-OH (73)



Eine Lösung aus **72** (2.35 g, 2.57 mmol, 1.0 Äq.) in abs. THF (50 mL) wurde mit TBAF·3H₂O (1.62 g, 5.14 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und eine Stunde bei RT gerührt. Es wurden 200 ml halbgesättigter NaHCO₃-Lösung zugesetzt, weitere 15 min gerührt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Der Feststoff wurde dreimal mit je 20 mL Wasser sowie je dreimal mit 20 mL EtOAc sowie 20 mL Ether gewaschen und schließlich im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde 3x mit Pyridin koevaporiert um Reste von Wasser zu entfernen.

Ausbeute: 1.18 g (54%, 1.39 mmol), lila, amorpher Feststoff.

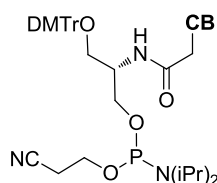
m/z (ESI(+)-ICT-HRMS): 718.3272 (100%) [M]⁺ (ber. für C₄₆H₄₄N₃O₅⁺: 718.3275).

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 8.47 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H_{Aryl}), 8.42 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H_{Aryl}), 7.96 (1H; d, *J* = 7.1 Hz, H_{Aryl}), 7.90 (1H, ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, H_{Aryl}), 7.84 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H_{Aryl}), 7.68 – 7.55 (4H, m, H_{Aryl}), 7.51 – 7.41 (3H, m, H_{Aryl}), 7.38 (2H, dt, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H_{Aryl}), 7.31 – 7.19 (7H, m, DMTr), 7.13 (1H, s, CH-Methin), 6.93 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, NH), 6.85 – 6.79 (4H, m, DMTr), 4.88 (2H, s, CH₂CO), 4.10 – 4.03 (1H, m, CH), 4.03 (3H, s, N-Me), 3.74 (6H, d, *J* = 0.7

Hz, 2xOMe), 3.62 (2H, ddd, $J = 21.6, 11.0, 5.5$ Hz, CH₂), 3.13 (1H, dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 3.07 (1H, dd, $J = 9.3, 5.1$ Hz, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.96 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, CH₂OH).

¹³C-NMR: (126 MHz, CD₃CN) δ [ppm] = 166.8 (C_q), 159.6 (C_q), 152.1 (C_q), 149.5 (C_q), 146.1 (C_q), 144.9 (CH_{Aryl}), 143.6 (CH_{Aryl}), 140.0 (C_q), 139.6 (C_q), 137.0 (C_q), 137.0 (C_q), 134.1 (CH_{Aryl}), 133.5 (CH_{Aryl}), 131.0 (CH_{Aryl}), 129.0 (CH_{Aryl}), 128.8 (CH_{Aryl}), 127.8 (CH_{Aryl}), 127.7 (CH_{Aryl}), 126.7 (CH_{Aryl}), 126.6 (CH_{Aryl}), 126.0 (C_q), 118.6 (CH_{Aryl}), 117.6 (CH_{Aryl}), 114.0 (CH_{Aryl}), 111.4 (CH_{Aryl}), 108.6 (CH_{Aryl}), 98.8 (CH-Methin), 86.9 (C_q), 63.2 (CH₂), 62.2 (CH₂), 56.9 (CH₂-CO), 55.9 (2xOMe), 52.8 (CH), 43.3 (N-Me).

DMTr-Ser(CB)-Phosphoramidit (74)



Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde **73** (253 mg, 0.30 mmol, 1 Äq.) in 6 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit Et₃NiPr₂ (300 μ L, 1.80 mmol, 6 Äq.) sowie 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (200 μ L, 0.90 mmol, 3 Äq.) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt, dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung sowie einmal mit ges. NaCl-Lösung extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde zweimal mit Benzol ko-evaporiert. Zur DNA-Synthese wurde das Produkt in abs. MeCN gelöst (ca. 0.15 M) und über Molekularsieb 3 Å gelagert. Die erzielten Ausbeuten lagen zwischen 70 und 90%, wurden jedoch aufgrund der Schutzgas-Atmosphäre nicht für jede Phosphitylierungsreaktion bestimmt.

Farbstoffkupplung in Lösung

Das entsprechende *N*-carboxymethylierte Chromophor (20 μ mol) und PPTS (20 μ mol) wurden in DMF (1 mL) suspendiert und mit Ultraschall behandelt, sodass eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 40 μ mol) und Diisopropylcarbodiimid (DIC, 40 μ mol) zugegeben und bei 30 °C für 1 h inkubiert. Es wurden 20 nmol der **Ser(NH₂)**-Sonde in NaHCO₃-Lösung (100 μ L, 0.1 M) vorgelegt, mit 100 μ L der DMF-Aktivester-Lösung versetzt und für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 1.6 mL Isopropanol und Zentrifugation (14000 rpm für 10 min) wurde das Oligonukleotid ausgefällt, wobei der Großteil des Farbstoffs in Lösung verblieb. Der Überstand wurde entfernt, der Rückstand in Ammoniumacetat-Lösung (0.3 M, aq., 150 μ L) aufgenommen und erneut durch Zugabe von Isopropanol und Zentrifugation gefällt. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in 200 μ L Wasser aufgenommen, mittels Spritzenfilter von unlöslichen Bestandteilen befreit und schließlich per HPLC-RP-UV/Vis gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereint, das Lösemittel durch Gefriertrocknung entfernt und das Produkt entsalzt sowie per HPLC-RP-UV und MALDI-TOF-MS analysiert.

Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.6**Tabelle 6.7.1:** Analytische Daten der **Ser(BO)**-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(BO)	MALDI-TOF-MS		R _T / min
		ber.	gefunden	
neu-BO-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	8412 ^a	8415.3	18.2 ^c
neu-BO-b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	8398 ^b	8398.1	9.7 ^d
neu-BO-c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	8421 ^a	8425.2	18.2 ^c
neu-BO-n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXGTATTT	8423 ^b	8422.2	9.6 ^d
neu-BO-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXTATTT	8423 ^b	8423.1	9.7 ^d

[a] *Perseptive-Biosystems Voyager* MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix im negativen Modus, [M-2H]⁻; [b] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix im positiven Modus, [M]⁺; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient IX; [d] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.7.2: Analytische Daten der **Ser(CV)**-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(CV)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M] ⁺	gefunden	
neu-CV-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	8458	8454	9.1
neu-CV-b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	8442	8439	9.5
neu-CV-c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	8467	8464	9.5
neu-CV-d	GGTTTCAGTXATTATGCCGTTGTATTT	8467	8466	9.7
neu-CV-e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	8458	8461	10.0
neu-CV-f	GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTATTT	8467	8465	9.8
neu-CV-g	GGTTTCAGTTATXATGCCGTTGTATTT	8467	8466	9.6
neu-CV-h	GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTATTT	8458	8456	9.8
neu-CV-i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTATTT	8467	8466	9.0
neu-CV-j	GGTTTCAGTTATTATXCCGTTGTATTT	8442	8439	9.2
neu-CV-k	GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTATTT	8482	8480	9.1
neu-CV-l	GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTATTT	8482	8480	9.6
neu-CV-m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	8442	8439	9.2
neu-CV-n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXGTATTT	8467	8465	9.3
neu-CV-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXTATTT	8467	8466	9.9

[a] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.7.3: Analytische Daten der **Ser(CB)**-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(CB)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M] ⁺	gefunden	
neu-CB-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	8458	8456	9.4
neu-CB-b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	8442	8439	9.7
neu-CB-c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	8467	8465	9.5
neu-CB-d	GGTTTCAGTXATTATGCCGTTGTATTT	8467	8465	9.8
neu-CB-e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	8458	8455	9.9
neu-CB-f	GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTATTT	8467	8465	9.5
neu-CB-g	GGTTTCAGTTATXATGCCGTTGTATTT	8467	8468	9.8
neu-CB-h	GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTATTT	8458	8460	9.5
neu-CB-i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTATTT	8467	8466	9.4
neu-CB-j	GGTTTCAGTTATTATXCCGTTGTATTT	8442	8440	9.4
neu-CB-k	GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTATTT	8482	8480	9.8
neu-CB-l	GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTATTT	8482	8481	9.9
neu-CB-m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	8442	8441	9.5
neu-CB-n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXGTATTT	8467	8465	9.4
neu-CB-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXTATTT	8467	8466	10.0

[a] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

6. Experimenteller Teil

Tabelle 6.7.4: Analytische Daten der **Ser(TR)**-Sonden zur Detektion von *Neuraminidase*-mRNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TR)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M] ⁺	gefunden	
neu-TR-a	GGTTTC X GTTATTATGCCGTTGTATTT	8490	8489	10.1
neu-TR-b	GGTTTC A TTATTATGCCGTTGTATTT	8474	8470	10.2
neu-TR-c	GGTTTCAG T ATTATGCCGTTGTATTT	8499	8497	9.9
neu-TR-d	GGTTTCAG T ATTATGCCGTTGTATTT	8499	8498	10.1
neu-TR-e	GGTTTCAGTT X TTATGCCGTTGTATTT	8490	8489	10.2
neu-TR-f	GGTTTCAGTT A XTATGCCGTTGTATTT	8499	8498	10.1
neu-TR-g	GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	8499	8499	10.1
neu-TR-h	GGTTTCAGTTATT X TGCCGTTGTATTT	8490	8487	10.2
neu-TR-i	GGTTTCAGTTATT A XGCCGTTGTATTT	8499	8496	10.2
neu-TR-j	GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	8474	8475	10.1
neu-TR-k	GGTTTCAGTTATTATG X CGTTGTATTT	8514	8514	10.0
neu-TR-l	GGTTTCAGTTATTATGC X GTTGTATTT	8514	8516	10.0
neu-TR-m	GGTTTCAGTTATTATGCC X TTGTATTT	8474	8475	10.2
neu-TR-n	GGTTTCAGTTATTATGCCG X TGTATTT	8499	8497	10.1
neu-TR-o	GGTTTCAGTTATTATGCCG T XGTATTT	8499	8498	10.1

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.7.5: Analytische Daten der **Ser(TO)**-DNA-Sonden zur Detektion von *vasa*-RNA.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M] ⁺	gefunden	
vasa1-1	TCTAT X TTTCATCATTTTCA	5874	5874	9.5
vasa1-2	TCTATT X TCATCATTTTCA	5874	5874	9.7
vasa1-3	TCTATTTT C XTCATTTTCA	5865	5866	9.6
vasa1-4	TCTATTTTTCATCAT X TTCA	5874	5875	9.6
vasa2-1	TCCAT X TTTCATTATTTTCT	5865	5866	9.5
vasa2-2	TCCATTTT C XTTATTTTCT	5856	5858	9.6
vasa2-3	TCCATTTTCATT X TTTTCT	5856	5857	9.7
vasa2-4	TCCATTTTCATTAT X TTCT	5865	5866	9.6
vasa3-1	TCTTG X TCCAAC TTGTC	5283	5283	9.5
vasa3-2	TCTTGATCC X ACTTGTGTC	5283	5282	9.1
vasa3-3	TCTTGATCCA X TTGTC	5307	5306	9.2
vasa3-4	TCTTGATCCAAC X TGTC	5292	5292	9.2
vasa4-1	GGCC X CCGTTTTTCCTG	5300	5300	8.9
vasa4-2	GGCCG C XTTTTTTCCTG	5300	5299	9.2
vasa4-3	GGCCG C GXTTTTTTCCTG	5325	5325	8.8
vasa4-4	GGCCG C GTTXTTTCCTG	5325	5392	9.2
vasa5-1	GGA A X TACTTGTTGGGC	5437	5437	8.8
vasa5-2	GGA A CTAC X TGTTGGGC	5422	5421	8.7
vasa5-3	GGA A CTACTT X TGTTGGGC	5397	5397	9.1
vasa5-4	GGA A CTACTTG T XGGGC	5422	5422	8.6

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.7.6: Analytische Daten der **Ser(TO)**-markierten 1-Nt-Abstand-Sonden zur Detektion von *vasa*-RNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
vasa-TO-1	<u>TCTATTTT</u> C <u>XTL</u> CATTTTCA	6341.2	6340.1	10.0
vasa-TO-2	<u>TCCATTTT</u> C <u>XTL</u> TATTTTCT	6332.2	6332.0	10.1
vasa-TO-3	<u>TCTTGATCCA</u> A <u>CTL</u> GTC	5777.9	5777.1	9.8
vasa-TO-4	<u>GGCCGCGG</u> T <u>XTL</u> TCCTG	5853.0	5851.4	9.9
vasa-TO-5	<u>GGA</u> ACTAC X <u>TL</u> GTTGGGC	5936.0	5935.1	9.6

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

6.7. Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.6

Tabelle 6.7.7: Analytische Daten der **Ser(CB)**-markierten 1-Nt-Abstand-Sonden zur Detektion von *vasa*-RNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(CB)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
vasa-CB-1	<u>TCTATTTTCYT</u> _L <u>CATTTTCA</u>	6335	6335	10.1
vasa-CB-2	<u>TCCATTTTCYT</u> _L <u>TATTTTCT</u>	6326	6326	10.1
vasa-CB-3	<u>TCTTGATCCAACYT</u> _L <u>GTC</u>	5772	5771	10.0
vasa-CB-4	<u>GGCCGCCGTTYT</u> _L <u>TCCTG</u>	5847	5846	9.9
vasa-CB-5	<u>GGAACTACYT</u> _L <u>GTTGGGC</u>	5930	5929	9.8

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

6.8 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.7

Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.7

Tabelle 6.8.1: Analytische Daten der Sonden zur Detektion von der Editierung der *NADH-Dehydrogenase*-RNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO), Y= Ser(CB)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
ndhd-TO-DNA-ed	GGAAAATAATTXATAGAAAAG	6715	6714	9.16
ndhd-TO-LNA-ed	GGAAAATAATTXALTAGAAAAG	6743	6741	9.42
ndhd-TO-DNA-un	GGAAAATAATTXGTAGAAAAG	6731	6732	9.18
ndhd-TO-LNA-un	GGAAAATAATTXGLTAGAAAAG	6759	6758	9.19
ndhd-CB-DNA-ed	GGAAAATAATTYATAGAAAAG	6709	6709	9.30
ndhd-CB-LNA-ed	GGAAAATAATTYALTAGAAAAG	6737	6737	9.41
ndhd-CB-DNA-un	GGAAAATAATTYGTAGAAAAG	6725	6725	9.30
ndhd-CB-LNA-un	GGAAAATAATTYGLTAGAAAAG	6753	6754	9.42

[a] Tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

Tabelle 6.8.2: Analytische Daten der Sonden zur Detektion von der Editierung der *Glycineren Rezeptor-α3*-RNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO), Y= Ser(CB)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M] ⁺	gefunden	
GlyRα3-TO-LNA-ed-1	AATAAACTGAA ^L XCAGGGT	5764	5767	9.08
GlyRα3-TO-LNA-ed-2	AATAAACTGAA ^L XCAG	4801	4802	9.22
GlyRα3-TO-LNA-un-1	AATAAACTGAG ^L XCAGGGT	5780	5780	8.96
GlyRα3-TO-LNA-un-2	AATAAACTGAG ^L XCAG	4817	4817	9.16
GlyRα3-CB-LNA-ed-1	AATAAACTGAA ^L YCAGGGT	5758	5759	9.12
GlyRα3-CB-LNA-ed-2	AATAAACTGAA ^L YCAG	4795	4796	9.56
GlyRα3-CB-LNA-un-1	AATAAACTGAG ^L YCAGGGT	5774	5776	9.17
GlyRα3-CB-LNA-un-2	AATAAACTGAG ^L YCAG	4811	4813	9.44

[a] Tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

6.9 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.8

Enzymatische Reaktionen

Vorbemerkung: Restriktionsenzyme, Ligasen, Kinasen und Phosphatasen sowie die Reaktionspuffer und ATP wurden von *New England Biolabs Inc.* (Ipswich, USA) bezogen und laut Herstellerangaben verwendet (einsehbar unter www.neb.com). Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Enzyme und Kits mit den jeweils mitgelieferten Pufferlösungen verwendet, sodass die Zusammensetzung der Puffer hier nicht angegeben wird.

Zur Oligomerisierung der Wiederholungseinheiten wurden die einzelnen Oligonukleotide (300 pmol) mittels *T4-Polynukleotid-Kinase* (25 u) unter Zugabe von ATP (1 nmol) bei 37 °C über Nacht phosphoryliert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung durch Erhitzen auf 95 °C (5 min) und anschließendem Abkühlen auf RT. Die Oligomerisierung erfolgte in NEB3.1-Puffer (1x) unter Verwendung des DNA-Duplex (100 pmol), ATP (2 nmol), *BamHI* (40 u), *BglII* (20 u) und *T4-DNA-Ligase* (800 u) unter Thermozyklisierung (6 Zyklen à 10 min bei 16 °C und 5 min bei 37 °C). Die Produktmischung wurde per Gelelektrophorese (1.6% Agarose) getrennt, entsprechende Produktbanden ausgeschnitten und durch ein *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*, Venlo, Niederlande) gereinigt.

Zur Ligation wurde das Ziel-Plasmid mittels entsprechender Restriktionsenzyme geschnitten (*BamHI* für Oligomerisierungsprodukte, *BamHI* und *XmaI* zur Insertion größerer Fragmente aus **pVE3**) und durch *CIP* (*Calf Intestinal Phosphatase*)-Behandlung dephosphoryliert. Anschließend wurden das entsprechende Fragment und das Zielplasmid im molaren Verhältnis von 5:1 unter Anwesenheit von *T4-DNA-Ligase* (400 u) umgesetzt. Die Transformation in chemisch kompetente Zellen (*New England Biolabs 10-beta*, *E. coli*) erfolgte nach Herstellerangabe. Die Zellen wurden über Nacht unter Kanamycin-Selektionsdruck bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Einige Kolonien wurden in Kulturröhrchen über Nacht vermehrt und ihre Plasmid-DNA isoliert. Die Analyse erfolgte durch Restriktion und Gelelektrophorese sowie DNA-Sequenzierung. Die Sequenzierung wurde von *SourceBioscience* (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Nach derselben Prozedur erfolgte ebenfalls die Darstellung von „pVE3-F-Tag-Plasmiden“. Die vollständigen Plasmidkarten mit allen relevanten Restriktionschnittstellen befinden sich im Anhang (Kapitel 9.7).

Zur Klonierung der Wiederholungseinheiten wurden folgende Oligonukleotide von *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) bezogen:

TO Tag_for

GATCC TAATCAACGGC T TAATCAACGGC A TAATCAACGGC G TAATCAACGGC A

TO Tag_rev

GATCT GCCGTTGATTA C GCCGTTGATTA T GCCGTTGATTA A GCCGTTGATTA G

BOTO Tag_for

GATCC TAATCAACGGC CGGACGTGCAT C TAATCAACGGC CGGACGTGCAT A

BOTO Tag_rev

GATCT ATGCACGTCCG GCCGTTGATTA G ATGCACGTCCG GCCGTTGATTA G

BO_for-A: CCGGGGGATCCGGACGTGCATTAGCGGACGTGCATACTCGGACGTGCATC
CACGGACGTGCAT

BO_rev-A: GACTATGCACGTCCGTGGATGCACGTCCGAGTATGCACGTCCGCTAATGC
ACGTCCG GATCCC

BO_for-B: AGTCCGGACGTGCATGACCGGACGTGCATATGCGGACGTGCATAGCCGGA
CGTGCAT

BO_rev-B: CACAGATGCACGTCCGGCTATGCACGTCCGCATATGCACGTCCGGTCATG
CACGTCCG

BO_for-C: CTGTGCGGACGTGCATGTTCCGGACGTGCATGAGCGGACGTGCATTGACGG
ACGTGCATA

BO_rev-C: GATCTATGCACGTCCGTCAATGCACGTCCGCTCATGCACGTCCGAACATG
CACGTCCG



Abbildung 6.9.1: Klonierungsstrategie zur Generierung von jeweils 12xBO-Wiederholungseinheiten.

***In vitro*-Transkription**

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit einem *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit* der Firma *New England Biolabs Inc.* nach Herstellerangabe. Zur Verfolgung der *in vitro*-Transkription in Echtzeit wurde ebenfalls nach Herstellerprotokoll verfahren, jedoch wurde das Reaktionsvolumen auf 150 µL vergrößert und die entsprechende(n) FIT-Sonde(n) (jeweils 333 nM) vorgelegt bevor die Transkription gestartet wurde.

Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Das Protokoll zum waschfreien *FISH* in Oozyten (Kapitel 6.4) wurde geringfügig abgeändert. Die jeweiligen HEK-Zellen wurden in para-Formaldehyd (2-4% in PBS-Puffer) für 10 bis 15 min fixiert, die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Hybridisierung wurden die Zellen für 3 min bei 92 °C in FITsh-Puffer (10mM HEPES, 100 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.3%Tween-20, pH 7.7) inkubiert und danach 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden mit einer 0.2 µM Lösung (in obengenanntem Puffer) der jeweiligen Sonde(n) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationslösung wurde entfernt und durch reinen FITsh-Puffer ersetzt. Zur Mikroskopie wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit Glasboden oder auf Objektträger überführt. Für Experimente mit Zellkernfärbung wurde die Zellen für 3 min mit Höchst 33342 (*Life Technologies*, 2 µg/mL) inkubiert und dreimal mit FITsh-Puffer gewaschen.

Weitfeldmikroskopie

Die Fluoreszenzbildgebung erfolgte an einem *Eclipse Ti inverted Fluorescence Microscope* der Firma *Nikon* (Tokio, Japan), ausgerüstet mit einer *200Lumen Fluorescence Lamp* (*Prior Scientific*, Rockland, USA), einem *Shutter Lambda SC* (*Shutter Instruments*, Novato, USA), einer *ProScan3*

H117 Automated Stage (Prior Scientific) sowie einem *NL2000 Incubator* der Firma *Pecon* (Erbach, Deutschland). Die Aufnahmen erfolgten mit einer *Orca R2 CCD Camera* (*Hamamatsu Photonics*, Hamamatsu, Japan). Die Bildanalyse erfolgte mit der „*NIS-Elements AR Imaging Software*“ der Firma *Nikon*. Es kamen folgende Filter zum Einsatz:

DIC (Durchlicht); Belichtungszeit: 10-60 ms, low light mode.

CFP-Filter: Anregung: 436/20 nm, Emission: 480/40 nm (Höchst, BO); Belichtungszeit: 50 ms, low light mode, Kontrastverstärkung: 255.

GFP-Filter: Anregung: 470/40 nm, Emission: 525/50 nm (TO); Belichtungszeit: 100 ms, low light mode, Kontrastverstärkung: 255

YFP-Filter: Anregung: 500/20 nm, Emission: 535/30 nm (TO); Belichtungszeit: 300-600 ms, low light mode, Kontrastverstärkung: 255

mCherry-Filter: Anregung: 560/40 nm, Emission: 630/75 nm (mCherry); Belichtungszeit: 5 ms, low light mode, Kontrastverstärkung: 255

Cy5.5-Filter: Anregung: 650/45 nm, Emission: 720/60 nm (IRFP); Belichtungszeit: 1 s, low light mode, Kontrastverstärkung: 255

Analytische Daten der Sonden zu Kapitel 4.7

Tabelle 6.9.1: Analytische Daten der **Ser(TO)**-markierten F-Tag-DNA Sonden.

Name	Sequenz, X = Ser(BO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
F-Tag(TO)-DNA-a	GCGCC X TTGATTAGTTAGC	5990	5990	17.6
F-Tag(TO)-DNA-b	GCGCCG X TGATTAGTTAGC	6015	6019	17.1
F-Tag(TO)-DNA-c	GCGCCG TX GATTAGTTAGC	6015	6018	17.2
F-Tag(TO)-DNA-d	GCGCCG TTX ATTAGTTAGC	5990	5996	16.9
F-Tag(TO)-DNA-e	GCGCCG TTGX TTAGTTAGC	6006	6014	16.8
F-Tag(TO)-DNA-f	GCGCCG TTGAX TAGTTAGC	6015	6019	17.0
F-Tag(TO)-DNA-g	GCGCCG TTGATX AGTTAGC	6015	6022	17.3
F-Tag(TO)-DNA-h	GCGCCG TTGATTX GTTAGC	6006	6011	17.1
F-Tag(TO)-DNA-i	GCGCCG TTGATTAX TTAGC	5990	5994	16.9
F-Tag(TO)-DNA-j	GCGCCG TTGATTAGX TAGC	6015	6018	16.6

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient X.

Tabelle 6.9.2: Analytische Daten der **Ser(BO)**-markierten F-Tag-DNA Sonden.

Name	Sequenz, Y = Ser(BO)	MALDI-TOF-MS ^a		R _T / min ^b
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
F-Tag(BO)-DNA-a	GCYAATATGCACGTCCGT	5605	5605	8.9
F-Tag(BO)-DNA-b	CGCYAATATGCACGTCCG	5590	5590	8.7
F-Tag(BO)-DNA-c	GCAYATATGCACGTCCGT	5605	5606	8.8
F-Tag(BO)-DNA-d	GCAAYTATGCACGTCCGT	5605	5605	8.9
F-Tag(BO)-DNA-e	CAAYTATGCACGTCCGTC	5565	5566	8.9
F-Tag(BO)-DNA-f	CAAAATATGCACGTCCGTC	5574	5574	8.8
F-Tag(BO)-DNA-g	CAAATYTGCACGTCCGTC	5565	5564	8.8
F-Tag(BO)-DNA-h	CAAATATGCACGTCTGTC	5589	5588	8.7
F-Tag(BO)-DNA-i	CAAATATGCACGTCTGTC	5589	5588	8.6
F-Tag(BO)-DNA-j	GCAAATATGCACGTCTGTC	5629	5628	8.7
F-Tag(BO)-DNA-k	GCAAATATGCACGTCTGTC	5614	5615	8.6
F-Tag(BO)-DNA-l	CGCAAATATGCACGTCTGTC	5599	5598	8.5

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

6. Experimenteller Teil

Tabelle 6.9.3: Analytische Daten der **Ser(TO)**-markierten F-Tag-LNA und 1-Nt-Abstand-Sonden.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
F-Tag(TO)-DNA-k	GCCGXTGATTA	3525	3526	10.4
F-Tag(TO)-LNA-a	GCCG _L XTGAT _L TA	3582	3582	10.9
F-Tag(TO)-LNA-b	G _L CCGXT _L GATTA	3582	3582	10.7
F-Tag(TO)-LNA-c	GCCG _L XTG _L ATTA	3582	3582	10.8
F-Tag(TO)-LNA-d	GCC _L GXTG _L ATT _L A	3596	3596	10.9
F-Tag(TO)-LNA-e	G _L CCGXT _L GATT _L A	3582	3582	10.6
F-Tag(TO)-LNA-f	GC _L CGXT _L GATTA	3610	3611	10.9
F-Tag(TO)-LNA-g	GCCG _L XT _L GATTA	3624	3625	10.2
F-Tag(TO)-mix-a	<u>GCCGXT_LGATTA</u>	3737	3736	11.7
F-Tag(TO)-mix-b	<u>GCCGXT_LGATTA</u>	3767	3766	11.9
F-Tag(TO)-mix-c	<u>GC_LCGXT_LGATTA</u>	3779	3777	12.1
F-Tag(TO)-mix-d	<u>GC_LCGXT_LGATTA</u>	3749	3749	12.1

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

Tabelle 6.9.4: Analytische Daten der **Ser(BO)**-markierten F-Tag-LNA und 1-Nt-Abstand-Sonden.

Name	Sequenz ^a , Y = Ser(BO)	MALDI-TOF-MS ^b		R _T / min ^c
		ber. [M-2H] ⁻	gefunden	
F-Tag(BO)-DNA-m	ATGCACGXCCG	3445	3445	9.8
F-Tag(BO)-LNA-a	AT _L GCACG _L XCCG	3516	3515	10.4
F-Tag(BO)-LNA-b	ATG _L CAC _L GXC _L G	3558	3557	10.0
F-Tag(BO)-LNA-c	AT _L GCACGX _C _L CG	3544	3543	11.1
F-Tag(BO)-LNA-d	ATG _L CACGX _C _L CG	3530	3529	10.5
F-Tag(BO)-LNA-e	ATG _C _L ACGX _C _L CG	3501	3502	10.6
F-Tag(BO)-LNA-f	ATG _L CACG _L X _C _L CG	3516	3515	10.2
F-Tag(BO)-LNA-g	AT _L GCAC _L GXC _L CG	3558	3558	10.5
F-Tag(BO)-mix-a	<u>ATGCACGY_C_LCG</u>	3684	3684	10.5
F-Tag(BO)-mix-b	<u>ATGCACGY_C_LCG</u>	3714	3715	10.6
F-Tag(BO)-mix-c	<u>ATG_C_LACGY_C_LCG</u>	3726	3727	10.8
F-Tag(BO)-mix-d	<u>ATG_C_LACGY_C_LCG</u>	3696	3697	10.7

[a] Unterstrichene Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ markiert LNA-Nukleotide; [b] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [c] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

7. Abkürzungsverzeichnis

2'-O-Me	2'-O-Methyl-RNA
6HC	6-Hydroxchinolin
Å	Ångström
a.u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
Abst.	Abstand
Äq.	Äquivalente
ber.	berechnet
BHQ	<i>Black-hole-Quencher</i>
BO	Thiazolgelb
Bp.	Basenpaar
Br	<i>brightness</i> (Helligkeit)
Bu	Butinol
c	Konzentration
CB	Chinolinblau
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE	Cyanoethyl (Schutzgruppe)
cHex	Cyclohexan
cRib	carbozyklische Ribose
CV	Chinolinviolett
Cy7	Cyanin-7
D	Diskriminierung
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
dG	Desoxyguanosin
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP & dTTP)
ds	Doppelstrang
dT	Desoxythymidin
e	Extinktionskoeffizient
em	Emission
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i> , und andere
EtOAc	Ethylacetat
ex	<i>Excitation</i> (Anregung)
F	Fluoreszenzquantenausbeute

7. Abkürzungsverzeichnis

FAM	Fluorescein
<i>FISH</i>	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FIT	<i>forced intercalation</i> (erzwungene Interkalation)
FP	Fluoreszenzprotein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
gef.	gefunden
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GNA	<i>Glycol</i> bzw. <i>Glycerol nucleic acid</i>
h	Stunde(n)
HPA	Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Inosin
<i>I</i>	Fluoreszenzintensität
JO	Oxazolopyridin
K	molare Fluoreszenz
kDa	Kilodalton
l	Wellenlänge
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MALDI	<i>matric assisted laser desorption and ionization</i>
max	maximal
MB	<i>molecular beacon</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
min	Minute(n)
MO	Thiazolopyridin
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
neu	<i>Neuraminidase</i> (RNA)
nm	Nanometer
NMM	<i>N-Methylmorpholin</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonanz</i> (kernmagnetische Resonanz)
Nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
osk	<i>Oskar</i> (RNA)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PNA	Peptid-Nukleinsäure
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RNA	Ribonukleinsäure

RNP	Ribonukleotidpartikel
RP	<i>reverse phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit (HPLC)
s	Sekunde(n)
SBR	Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis
Ser	Serinol
slit	Schlitzbreite des Fluoreszenzspektrometer
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SQ	<i>self-quenching</i> , gegenseitige Löschung
ss	Einzelstrang
TAMRA	Tetramethylrhodamine
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
T _M	Schmelztemperatur
TO	Thiazolorange
TOF	<i>time of flight</i>
TR	Thiazolrot
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vis	visible
vs.	<i>versus</i>
wt	Wildtyp
δ	chemische Verschiebung (NMR)

8. Literaturverzeichnis

- [1] I. H. G. S. Consortium, *Nature* **2004**, 431, 931-945.
- [2] L. Hood, D. Galas, *Nature* **2003**, 421, 444-448.
- [3] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton *et al.*, *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
- [4] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody *et al.*, *Nature* **2001**, 409, 860-921.
- [5] W. Feero, *JAMA* **2014**, 311, 1017-1019.
- [6] K. V. Voelkerding, S. A. Dames, J. D. Durtschi, *Clin. Chem.* **2009**, 55, 641-658.
- [7] J. Shendure, H. Ji, *Nat Biotech* **2008**, 26, 1135-1145.
- [8] E. Check-Hayden, *Nature* **2014**, 507, 294-295.
- [9] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell *et al.*, *Nature* **1986**, 321, 674-679.
- [10] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, 74, 5463-5467.
- [11] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441-448.
- [12] H. Bayley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 628-637.
- [13] S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley, *Nat Biotech* **2001**, 19, 636-639.
- [14] www.illumina.com
- [15] [doi:10.1038/nature.2014.14530](https://doi.org/10.1038/nature.2014.14530)
- [16] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Nat Biotech* **1993**, 11, 1026-1030.
- [17] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, *Genome Res.* **1996**, 6, 986-994.
- [18] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96, 9236-9241.
- [19] H. Yan, Z. Dobbie, S. B. Gruber, S. Markowitz, K. Romans, F. M. Giardiello *et al.*, *Nat. Genet.* **2002**, 30, 25-26.
- [20] C. M. Hindson, J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson *et al.*, *Nat Meth* **2013**, 10, 1003-1005.
- [21] M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, 12, 861-874.
- [22] T. R. Mercer, M. E. Dinger, J. S. Mattick, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 155-159.
- [23] S. Memczak, M. Jens, A. Elefsinioti, F. Torti, J. Krueger, A. Rybak *et al.*, *Nature* **2013**, 495, 333-338.
- [24] K. S. Kosik, *Nature* **2013**, 495, 322-324.
- [25] T. B. Hansen, T. I. Jensen, B. H. Clausen, J. B. Bramsen, B. Finsen, C. K. Damgaard *et al.*, *Nature* **2013**, 495, 384-388.
- [26] A. Bashirullah, R. L. Cooperstock, H. D. Lipshitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 335-394.
- [27] C. Medioni, K. Mowry, F. Besse, *Development* **2012**, 139, 3263-3276.
- [28] F. Puvion-Dutilleul, R. Roussev, E. Puvion, *J Struct Biol* **1992**, 108, 209-220.
- [29] A. Nanbo, S. Watanabe, P. Halfmann, Y. Kawaoka, *Sci. Rep.* **2013**, 3.
- [30] B. Modrek, C. Lee, *Nat. Genet.* **2002**, 30, 13-19.
- [31] M. Sultan, M. H. Schulz, H. Richard, A. Magen, A. Klingenhoff, M. Scherf *et al.*, *Science* **2008**, 321, 956-960.
- [32] R. Hiesel, B. Wissinger, W. Schuster, A. Brennicke, *Science* **1989**, 246, 1632-1634.
- [33] M. Takenaka, A. Zehrmann, D. Verbitskiy, B. Härtel, A. Brennicke, *Annu. Rev. Genet.* **2013**, 47, 335-352.

- [34] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci* **1995**, 20, 448-455.
- [35] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269-272.
- [36] K. M. Dean, A. E. Palmer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 512-523.
- [37] D. Jung, K. Min, J. Jung, W. Jang, Y. Kwon, *Molecular BioSystems* **2013**, 9, 862-872.
- [38] A. Jablonski, *Nature* **1933**, 131, 839-840.
- [39] J. Franck, E. G. Dymond, *T Faraday Soc* **1926**, 21, 536-542.
- [40] E. Condon, *Physical Review* **1926**, 28, 1182-1201.
- [41] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Berlin **2006**, 3rd. Edition.
- [42] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 225-230.
- [43] D. L. Dexter, *The Journal of Chemical Physics* **1953**, 21, 836-850.
- [44] O. Stern, M. Volmer, *Phys Z* **1919**, 20, 183-188.
- [45] R. F. Khairutdinov, N. Serpone, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, 101, 2602-2610.
- [46] S. Ikeda, A. Okamoto, *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 958-968.
- [47] J. B. Birks, *Rep. Prog. Phys.* **1975**, 38, 903-974.
- [48] W. West, S. Pearce, *The Journal of Physical Chemistry* **1965**, 69, 1894-1903.
- [49] T. Forster, *Angew. Chem.* **1948**, 60, 163-164.
- [50] T. Forster, *Angew. Chem.* **1948**, 60, 24-25.
- [51] T. Kato, H. Kashida, H. Kishida, H. Yada, H. Okamoto, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 741-750.
- [52] P. Zhang, T. Beck, W. H. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 402-405.
- [53] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1191-1196.
- [54] H.-Y. Hu, S. Gehrig, G. Reither, D. Subramanian, M. A. Mall, O. Plettenburg *et al.*, *Biotechnology Journal* **2014**, 9, 266-281.
- [55] A. Miyawaki, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, 80, 357-373.
- [56] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 6131-6148.
- [57] M. Majlessi, N. C. Nelson, M. M. Becker, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 2224-2229.
- [58] B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinasso *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 14514-14522.
- [59] M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, 6, 535-539.
- [60] A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4381-4384.
- [61] P. Nielsen, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 2645-2646.
- [62] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5401-5404.
- [63] K. E. Nielsen, S. K. Singh, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 228-238.
- [64] M. Petersen, A. E. Hakansson, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7431-7432.
- [65] K. M. E. Nielsen, M. Petersen, A. E. Hakansson, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 3001-3009.
- [66] M. Petersen, K. Bondensgaard, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5974-5982.
- [67] K. E. Nielsen, J. Rasmussen, R. Kumar, J. Wengel, J. P. Jacobsen, M. Petersen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 449-457.

- [68] A. A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V. K. Rajwanshi, S. K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13252-13253.
- [69] S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 455-456.
- [70] Y. You, B. G. Moreira, M. A. Behlke, R. Owczarzy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e60.
- [71] M. D. Sorensen, L. Kvaerno, T. Bryld, A. E. Hakansson, B. Verbeure, G. Gaubert *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2164-2176.
- [72] J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.
- [73] N. Ueda, T. Kawabata, K. Takemoto, *J. Heterocycl. Chem.* **1971**, *8*, 827-829.
- [74] O. L. Acevedo, R. S. Andrews, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3931-3934.
- [75] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175.
- [76] M. K. Schlegel, L.-O. Essen, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8158-8159.
- [77] E. Meggers, L. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1092-1102.
- [78] D. Cook, L. Acevedo, W. Davis, J. Ecker, N. Hebert, Google Patents, **2002**.
- [79] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [80] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310-1313.
- [81] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [82] A. F. Faruqi, M. Egholm, P. M. Glazer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 1398-1403.
- [83] D. F. Doyle, D. A. Braasch, C. G. Simmons, B. A. Janowski, D. R. Corey, *Biochemistry-U S* **2001**, *40*, 53-64.
- [84] U. Koppelhus, S. K. Awasthi, V. Zachar, H. U. Holst, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, *Antisense Nucleic A* **2002**, *12*, 51-63.
- [85] U. Koppelhus, P. E. Nielsen, *Adv. Drug Del. Rev.* **2003**, *55*, 267-280.
- [86] A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2152-2167.
- [87] C. G. Simmons, A. E. Pitts, L. D. Mayfield, J. W. Shay, D. R. Corey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3001-3006.
- [88] P. Zhou, M. Wang, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6878-6879.
- [89] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, G. F. He, B. Bhattacharya, J. J. Hyldig-Nielsen, G. Zon *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16104-16112.
- [90] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258-10267.
- [91] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492-6497.
- [92] K. S. Ramasamy, W. Seifert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1799-1804.
- [93] R. Benhida, M. Devys, J.-L. Fourrey, F. Lecubin, J.-S. Sun, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6167-6170.
- [94] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217-2223.
- [95] V. A. Efimov, K. R. Birikh, D. B. Staroverov, S. A. Lukyanov, M. B. Tereshina, A. G. Zaraisky *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2247-2257.
- [96] F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 367-402.
- [97] B. P. Monia, J. F. Johnston, H. Sasmor, L. L. Cummins, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14533-14540.
- [98] S. Spitzer, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11691-11704.

- [99] J. W. Jaroszewski, V. Clausen, J. S. Cohen, O. Dahl, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 829-834.
- [100] S. A. Narang, *Tetrahedron* **1983**, 39, 3-22.
- [101] M. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281-285.
- [102] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride *et al.*, *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [103] M. J. Gait, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 8514-8516.
- [104] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5319-5324.
- [105] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [106] C. D. Claeboe, R. Gao, S. M. Hecht, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 5685-5691.
- [107] B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 1729-1743.
- [108] S. Berner, K. Mühlegger, H. Seliger, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 853-864.
- [109] B. Sproat, F. Colonna, B. Mullah, D. Tsou, A. Andrus, A. Hampel *et al.*, *Nucleosides and Nucleotides* **1995**, 14, 255-273.
- [110] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1046-1050.
- [111] S. Pitsch, P. A. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3773-3795.
- [112] R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1253-1254.
- [113] J. B. Lawrence, R. H. Singer, L. M. Marselle, *Cell* **1989**, 57, 493-502.
- [114] J. Bentley Lawrence, C. A. Villnave, R. H. Singer, *Cell* **1988**, 52, 51-61.
- [115] M. Carmofonseca, D. Tollervey, R. Pepperkok, S. M. L. Barabino, A. Merdes, C. Brunner *et al.*, *EMBO J.* **1991**, 10, 195-206.
- [116] M. Carmo-Fonseca, R. Pepperkok, B. S. Sproat, W. Ansorge, M. S. Swanson, A. I. Lamond, *EMBO J.* **1991**, 10, 1863-1873.
- [117] S. Paillason, M. Van De Corput, R. W. Dirks, H. J. Tanke, M. Robert-Nicoud, X. Ronot, *Exp. Cell Res.* **1997**, 231, 226-233.
- [118] C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. M. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaitre, A. K. Raap *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, art. no.-e89.
- [119] H. Maamar, A. Raj, D. Dubnau, *Science* **2007**, 317, 526-529.
- [120] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, 280, 585-590.
- [121] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, 5, 877-879.
- [122] <http://singlemoleculefish.com>
- [123] H. S. Seidel, M. Ailion, J. Li, A. van Oudenaarden, M. V. Rockman, L. Kruglyak, *PLoS Biol.* **2011**, 9, e1001115.
- [124] S. Itzkovitz, A. Lyubimova, I. C. Blat, M. Maynard, J. van Es, J. Lees *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **2012**, 14, 106-114.
- [125] S. M. Singel, C. Cornelius, E. Zaganjor, K. Batten, V. R. Sarode, D. L. Buckley *et al.*, *Neoplasia (New York, N.Y.)* **2014**, 16, 247-256.e242.
- [126] N. Battich, T. Stoeger, L. Pelkmans, *Nat Meth* **2013**, 10, 1127-1133.
- [127] A. N. Player, L. P. Shen, D. Kenny, V. P. Antao, J. A. Kolberg, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2001**, 49, 603-611.
- [128] F. Wang, J. Flanagan, N. Su, L.-C. Wang, S. Bui, A. Nielson *et al.*, *The Journal of molecular diagnostics* **2012**, 14, 22-29.
- [129] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, R. M. Long, *Mol. Cell* **1998**, 2, 437-445.
- [130] S. Tyagi, *Nat Meth* **2009**, 6, 331-338.

- [131] G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25-47.
- [132] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [133] D. D. Root, C. Vaccaro, Z. Zhang, M. Castro, *Biopolymers* **2004**, *75*, 60-70.
- [134] G. Bonnet, O. Krichevsky, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 8602-8606.
- [135] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 6171-6176.
- [136] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4208-4215.
- [137] P. Santangelo, N. Nitin, G. Bao, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 39-50.
- [138] Z. Q. Cui, Z. P. Zhang, X. E. Zhang, J. K. Wen, Y. F. Zhou, W. H. Xie, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3245-3252.
- [139] X. H. Peng, Z. H. Cao, J. T. Xia, G. W. Carlson, M. M. Lewis, W. C. Wood *et al.*, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1909-1917.
- [140] P. Santangelo, N. Nitin, L. LaConte, A. Woolums, G. Bao, *J. Virol.* **2006**, *80*, 682-688.
- [141] W. Wang, Z. Q. Cui, H. Han, Z. P. Zhang, H. P. Wei, Y. F. Zhou *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4913-4928.
- [142] D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlana, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13308-13313.
- [143] L. Wang, C. Y. J. Yang, C. D. Medley, S. A. Benner, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15664-15665.
- [144] C. J. Yang, L. Wang, Y. R. Wu, Y. M. Kim, C. D. Medley, H. Lin *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4030-4041.
- [145] D. P. Bratu, I. E. Catrina, S. A. E. Marras, *Rna Detection and Visualization: Methods and Protocols* **2011**, *714*, 141-157.
- [146] I. E. Catrina, S. A. E. Marras, D. P. Bratu, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1586-1595.
- [147] H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. G. Liang, K. Niwa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044-7047.
- [148] R. Haner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [149] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e57.
- [150] A. K. Chen, O. Davydenko, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*.
- [151] D. Y. Vargas, A. Raj, S. A. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17008-17013.
- [152] X. M. Zhang, Y. Song, A. Y. Shah, V. Lekova, A. Raj, L. Huang *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*.
- [153] L. G. Lee, C.-H. Chen, L. A. Chiu, *Cytometry* **1986**, *7*, 508-517.
- [154] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803-2812.
- [155] H. P. Spielmann, D. E. Wemmer, J. P. Jacobsen, *Biochemistry-U S* **1995**, *34*, 8542-8553.
- [156] J. A. Bordelon, K. J. Feierabend, S. A. Siddiqui, L. L. Wright, J. T. Petty, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 4838-4843.
- [157] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
- [158] A. Yartsev, J.-L. Alvarez, U. Åberg, V. Sundström, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 281-289.
- [159] A. Sanchez-Galvez, P. Hunt, M. A. Robb, M. Olivucci, T. Vreven, H. B. Schlegel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2911-2924.
- [160] G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [161] N. Svanvik, G. Westman, D. Y. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.

- [162] N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 803-809.
- [163] N. Svanvik, A. Stahlberg, U. Sehlstedt, R. Sjoback, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, 287, 179-182.
- [164] J. Isacson, H. Cao, L. Ohlsson, S. Nordgren, N. Svanvik, G. Westman *et al.*, *Mol. Cell. Probes* **2000**, 14, 321-328.
- [165] E. Privat, U. Asseline, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 757-769.
- [166] E. Privat, T. Melvin, F. Merola, G. Schweizer, S. Prodhomme, U. Asseline *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 201-210.
- [167] U. Asseline, M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1949-1957.
- [168] R. Lartia, U. Asseline, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2270-2281.
- [169] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4263-4266.
- [170] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Gopferich, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239-1248.
- [171] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2418-2421.
- [172] S. Berndl, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2418-2421.
- [173] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7373-7379.
- [174] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1136-1138.
- [175] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H. A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 890-894.
- [176] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, A. Okamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6480-6484.
- [177] S. Ikeda, M. Yuki, H. Yanagisawa, A. Okamoto, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 7191-7195.
- [178] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1256-1261.
- [179] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, H. Yanagisawa, S. Tsuruma, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 546-551.
- [180] S. Ikeda, T. Kubota, K. Kino, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1719-1725.
- [181] K. Sugizaki, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2276-2281.
- [182] S. Ikeda, H. Yanagisawa, A. Nakamura, D. O. Wang, M. Yuki, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 4199-4204.
- [183] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *PloS one* **2010**, 5, e13003.
- [184] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2340-2343.
- [185] O. Kohler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [186] O. Kohler, D. Venkatrao, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69-77.
- [187] V. Karunakaran, J. L. Perez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernstring, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954-2962.
- [188] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Roder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 300-310.
- [189] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Roglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, 375, 318-330.
- [190] L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 114-125.
- [191] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 2051-2060.
- [192] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 1931-1934.
- [193] Y. Kam, A. Rubinstein, A. Nissan, D. Halle, E. Yavin, *Mol. Pharm.* **2012**, 9, 685-693.

- [194] E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9555-9559.
- [195] E. Socher, A. Knoll, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 7363-7371.
- [196] O. Kohler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.
- [197] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2439-2448.
- [198] S. Jessel, E. Hense, C. Meier, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26, 1181-1184.
- [199] L. Bethge, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2011**.
- [200] Andersson, Baechi, Hoechl, Richter, *J Microsc-Oxford* **1998**, 191, 1-7.
- [201] J. E. Aubin, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1979**, 27, 36-43.
- [202] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 4221-4245.
- [203] J. N. Wilson, J. M. Gao, E. T. Kool, *Tetrahedron* **2007**, 63, 3427-3433.
- [204] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3923-3933.
- [205] F. Samain, S. Ghosh, Y. N. Teo, E. T. Kool, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7025-7029.
- [206] C. K. Koo, F. Samain, N. Dai, E. T. Kool, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1910-1917.
- [207] S. S. Tan, S. J. Kim, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 2664-2671.
- [208] W. Jiang, S. L. Wang, L. H. Yuen, H. K. Kwon, T. Ono, E. T. Kool, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 3184-3190.
- [209] L. G. S. Brooker, G. H. Keyes, W. W. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 199-210.
- [210] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13, 300-310.
- [211] F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, 13, 2072-2081.
- [212] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2589-2599.
- [213] I. Pfeffer, *Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin* **2008**.
- [214] H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry-U.S.* **1997**, 36, 10581-10594.
- [215] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke *et al.*, *Biochemistry-U.S.* **2004**, 43, 3537-3554.
- [216] D. J. Kleinbaum, G. P. Miller, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1115-1120.
- [217] K. A. Cissell, E. A. Hunt, S. K. Deo, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 125-135.
- [218] C. J. Yang, H. Lin, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12772-12773.
- [219] Y. Saito, E. Mizuno, S. S. Bag, I. Suzuka, I. Saito, *Chem. Commun.* **2007**, 4492-4494.
- [220] E. Socher, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2010**.
- [221] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15, 11551-11558.
- [222] J. L. Uy, C. L. Asbury, T. W. Petersen, G. van den Engh, *Cytometry Part A* **2004**, 61A, 18-25.
- [223] S. Ghosh, V. Marchand, I. Gaspar, A. Ephrussi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 441-449.
- [224] J. B. Randolph, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2923-2929.
- [225] H. Asanuma, M. Akahane, N. Kondo, T. Osawa, T. Kato, H. Kashida, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3165-3169.
- [226] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 19025-19032.
- [227] R. Suyama, A. Jenny, S. Curado, W. Pellis-van Berkel, A. Ephrussi, *Development* **2009**, 136, 95-105.
- [228] N. C. Horton, B. C. Finzel, *J. Mol. Biol.* **1996**, 264, 521-533.
- [229] S. Loibl, *Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin* **2011**.
- [230] O. Hachet, A. Ephrussi, *Nature* **2004**, 428, 959-963.
- [231] M. Chekulaeva, M. W. Hentze, A. Ephrussi, *Cell* **2006**, 124, 521-533.

- [232] F. Hövelmann, I. Gaspar, S. Loibl, E. A. Ermilov, B. Röder, J. Wengel *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11370-11375.
- [233] M. M. Mhlanga, D. P. Bratu, A. Genovesio, A. Rybarska, N. Chenouard, U. Nehrbass *et al.*, *PloS one* **2009**, 4.
- [234] J. C. Alwine, D. J. Kemp, G. R. Stark, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, 74, 5350-5354.
- [235] S. Hahn, X. Y. Zhong, C. Troeger, R. Burgemeister, K. Gloning, W. Holzgreve, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, 57, 96-105.
- [236] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [237] Y. Ueno, J. Jose, A. Loudet, C. Pérez-Bolívar, P. Anzenbacher, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 133, 51-55.
- [238] R. Lartia, U. Asseline, *Chemistry – A European Journal* **2006**, 12, 2270-2281.
- [239] A. Raj, S. Tyagi, *Methods Enzymol.* **2010**, 472, 365-386.
- [240] A. Okamoto, S. Ikeda, T. Kubota, *EP2130835B1* **2008**.
- [241] A. A. Ishchenko, A. V. Kulinich, S. L. Bondarev, V. N. Knyukshto, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, 111, 13629-13637.
- [242] D. V. Jarikote, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2006**.
- [243] D. O. Wang, A. Okamoto, *J. Photochem. Photobiol., C* **2012**, 13, 112-123.
- [244] H. Ruwe, B. Castandet, C. Schmitz-Linneweber, D. B. Stern, *FEBS Lett.* **2013**, 587, 1429-1433.
- [245] K. Neckermann, P. Zeltz, G. L. Igloi, H. Kössel, R. M. Maier, *Gene* **1994**, 146, 177-182.
- [246] E. Kotera, M. Tasaka, T. Shikanai, *Nature* **2005**, 433, 326-330.
- [247] A. L. Chateigner-Boutin, I. Small, *Rna Biol* **2010**, 7, 213-219.
- [248] I. Gurevich, H. Tamir, V. Arango, A. J. Dwork, J. J. Mann, C. Schmauss, *Neuron* **2002**, 34, 349-356.
- [249] M. Higuchi, F. N. Single, M. Kohler, B. Sommer, R. Sprengel, P. H. Seeburg, *Cell* **1993**, 75, 1361-1370.
- [250] L. M. Powell, S. C. Wallis, R. J. Pease, Y. H. Edwards, T. J. Knott, J. Scott, *Cell* **1987**, 50, 831-840.
- [251] B. Teng, M. Verp, J. Salomon, N. O. Davidson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 20616-20620.
- [252] J. C. Meier, C. Henneberger, I. Melnick, C. Racca, R. J. Harvey, U. Heinemann *et al.*, *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 736-744.
- [253] N. Daigle, J. Ellenberg, *Nat. Methods* **2007**, 4, 633-636.
- [254] D. R. Larson, D. Zenklusen, B. Wu, J. A. Chao, R. H. Singer, *Science* **2011**, 332, 475-478.
- [255] O. Rackham, C. M. Brown, *EMBO J.* **2004**, 23, 3346-3355.
- [256] C. G. Cheong, T. M. T. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 13635-13639.
- [257] T. Ozawa, Y. Natori, M. Sato, Y. Umezawa, *Nat. Methods* **2007**, 4, 413-419.
- [258] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- [259] B. Xu, X. Wu, E. K. L. Yeow, F. Shao, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 6402-6405.
- [260] S. W. Jiang, M. A. Trujillo, N. L. Eberhardt, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3278-3279.
- [261] M. Bzymek, S. T. Lovett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 8319-8325.
- [262] J. Spitzer, M. Landthaler, T. Tuschl, *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* **2013**, 529, 99-124.
- [263] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2203-2206.
- [264] O. Kohler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69-77.<

- [265] D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, *Acs Nano* **2014**, 8, 1972-1994.
- [266] I. Martín, M. Teixidó, E. Giralt *ChemBioChem* **2011**, 12, 896-903.
- [267] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, 43, 2923-2925.
- [268] M. J. Cavalluzzi, P. N. Borer, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32.
- [269] C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro, *Biopolymers* **1970**, 9, 1059-1077.
- [270] <http://www.ribotask.com/calculator.asp>
- [271] Y. Ueno, J. Jose, A. Loudet, C. Perez-Bolivar, P. Anzenbacher, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 51-55.

9. Anhang

9.1 Anhang zu Kapitel 4.6

Fluoreszenzspektren zum Vergleich von Ser(TO), β cRib(TO) und α cRib(TO)

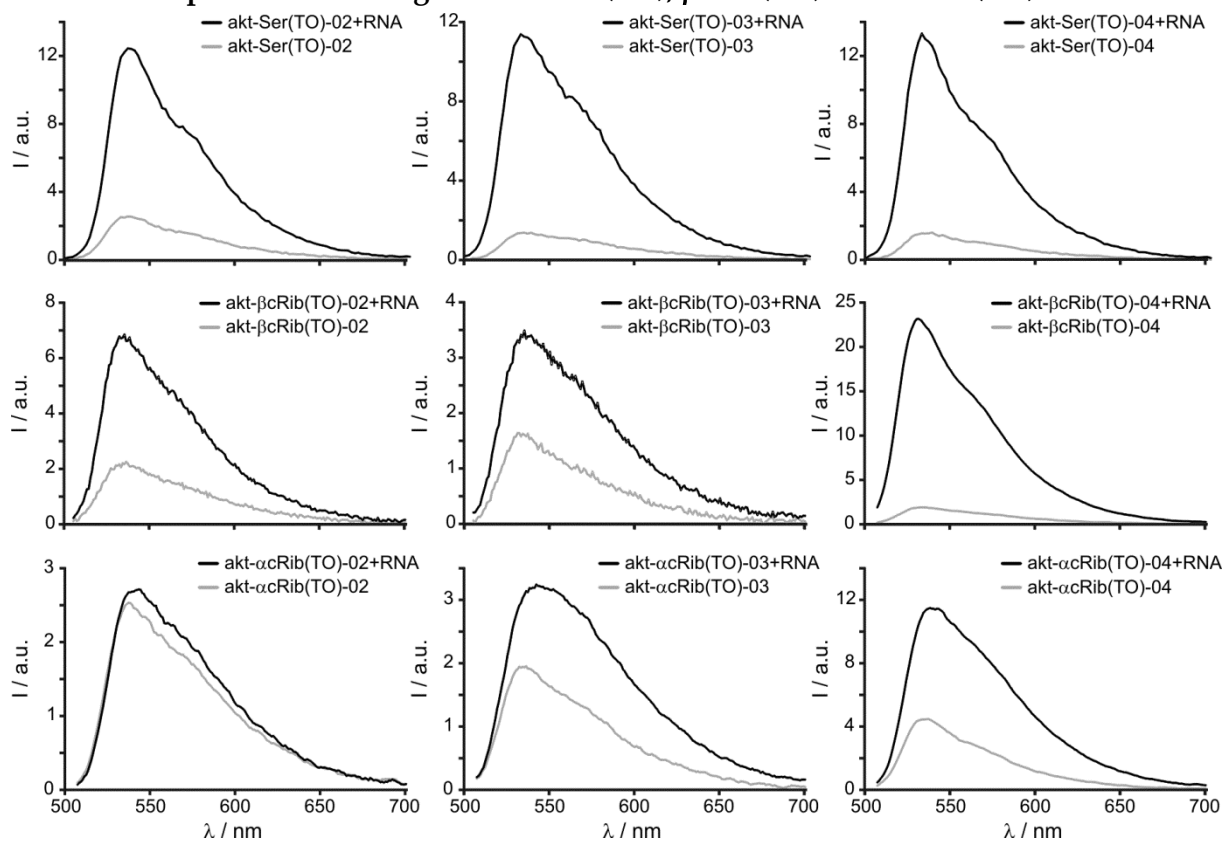


Abbildung 9.1.1: Fluoreszenzemission-Spektren der TO-markierten DNA FIT-Sonden vor (grau) und nach Hybridisierung (schwarz) mit komplementärer RNA. 1 μ M Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), $\lambda(\text{ex}) = 485$ nm, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700$ nm (für **Ser(TO)**), $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700$ nm (für **cRib(TO)**), slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Fluoreszenzspektren zum Vergleich von Ser(BO), β cRib(BO) und α cRib(BO)

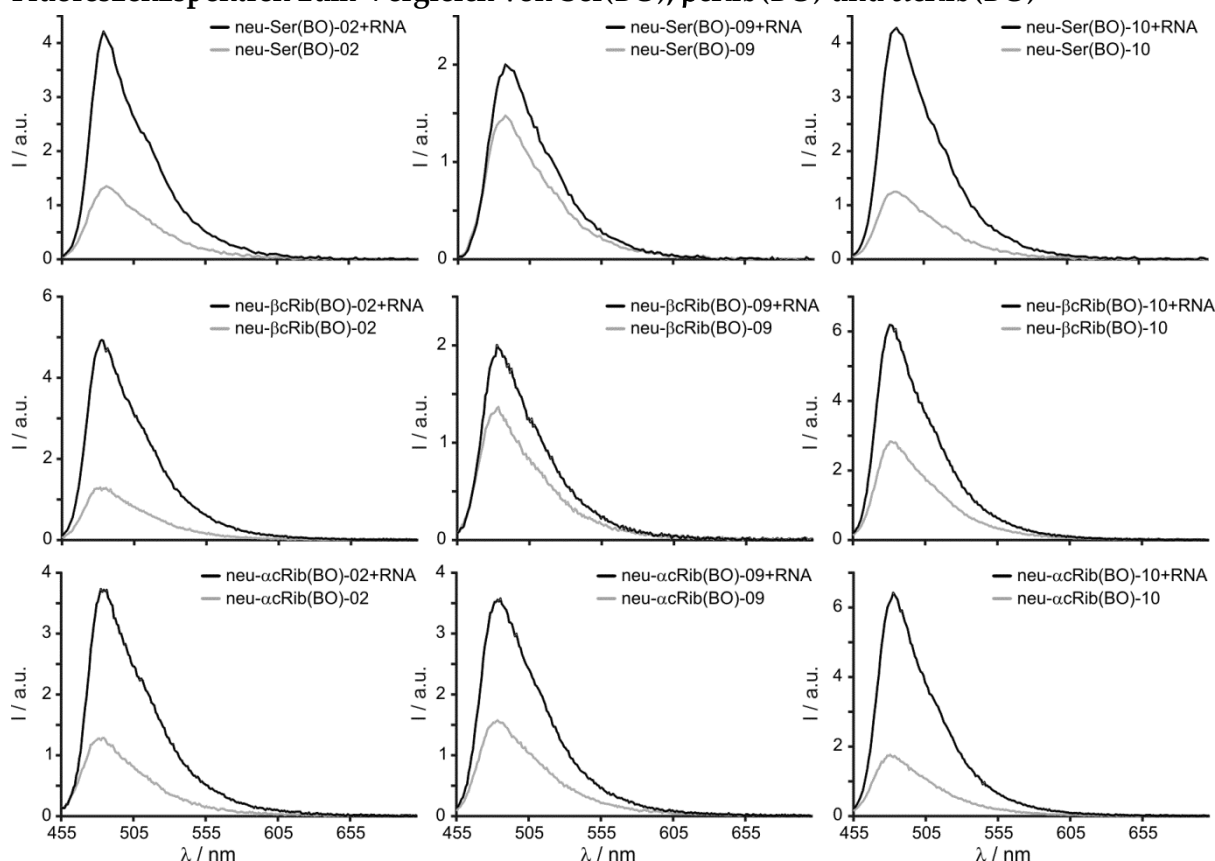


Abbildung 9.1.2: Fluoreszenzemission-Spektren der BO-markierten DNA FIT-Sonden vor (grau) und nach Hybridisierung (schwarz) mit komplementärer RNA. 1 μ M Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), λ (ex) = 440 nm, λ (em) = 455-700 nm, slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzanstiegs FIT-Sonden

Tabelle 9.1.1: Vergleich des Fluoreszenzanstiegs bei unterschiedlichen Temperaturen.

Name	Sequenz, X = Ser(TO)	I/I ₀		
		25 °C	37 °C	50 °C
neu-TO-a	GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	4.0	6.7	9.5
neu-TO-b	GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	4.5	5.6	6.4
neu-TO-c	GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	8.2	12.2	18.4
neu-TO-d	GGTTTCAGTXATTATGCCGTTGTATTT	2.6	3.7	4.4
neu-TO-e	GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	6.2	10.6	17.2
neu-TO-f	GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTATTT	3.9	5.0	6.7
neu-TO-g	GGTTTCAGTTATXATGCCGTTGTATTT	1.2	1.6	2.3
neu-TO-h	GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTATTT	4.5	6.2	9.7
neu-TO-i	GGTTTCAGTTATTAXGCCGTTGTATTT	1.2	1.4	2.2
neu-TO-j	GGTTTCAGTTATTATXCCGTTGTATTT	2.5	3.2	4.7
neu-TO-k	GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTATTT	3.4	4.8	7.0
neu-TO-l	GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTATTT	4.0	6.6	10.3
neu-TO-m	GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	6.1	9.7	16.8
neu-TO-n	GGTTTCAGTTATTATGCCGXGTATTT	8.3	12.0	19.7
neu-TO-o	GGTTTCAGTTATTATGCCGTXGTATTT	2.5	3.3	4.3

Bedingungen: 1 μ M Sonde und 5 Äq. **neu-RNA** (AAAUACAACGGCAUAAUAACUGAAACC), bei Zugabe in PBS, λ (ex) = 485 nm, λ (em) = 535 nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, bei 25 °C, 37 °C und 50 °C.

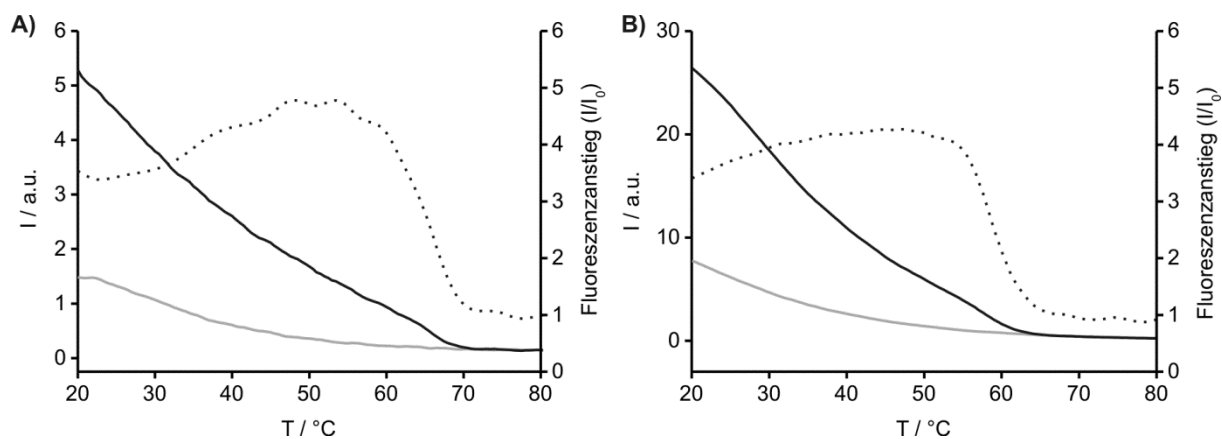


Abbildung 9.1.3: Temperaturabhängige Fluoreszenz der Sonden **neu- α Rib(BO)-02** (A) und **akt-Ser(TO)-02** (B) vor (grau) und nach Hybridisierung mit Ziel-RNA (schwarz) sowie der temperaturabhängige Fluoreszenzanstieg (gestrichelt). Bedingungen: 1 μM Sonde und 2.5 μM komplementäre RNA; bei Zugabe in PBS, BO: $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 485 \text{ nm}$, TO: $\lambda(\text{ex}) = 515 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, nm, slit(ex) = 2.5 nm, slit(em) = 5 nm, bei 20-80 $^\circ\text{C}$.

Vergleich von SYBR-Gold und FIT-Sonde während der PCR

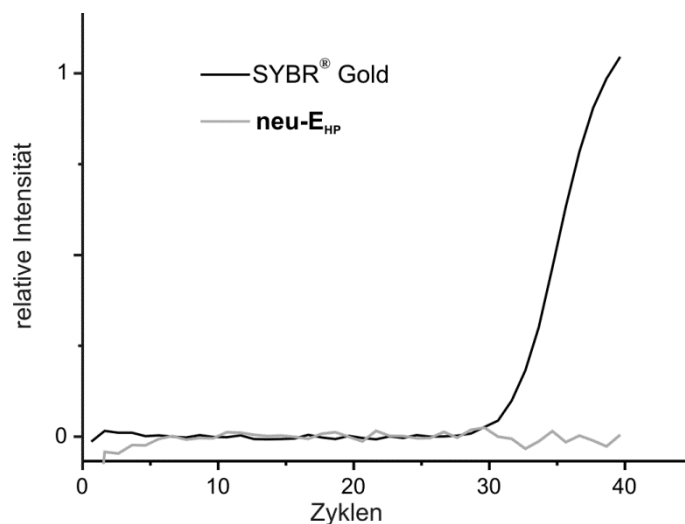
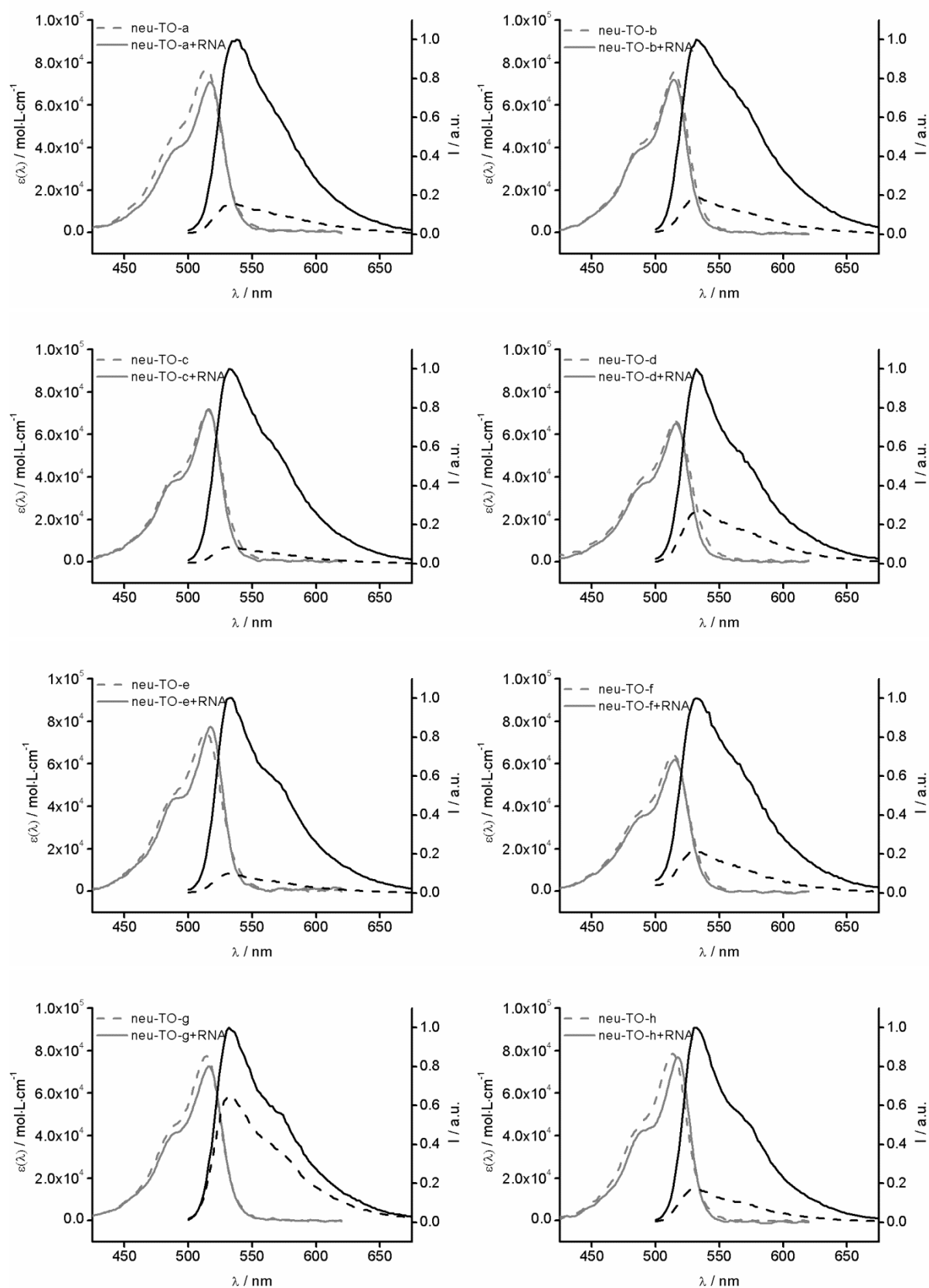


Abbildung 9.1.4: Vergleich Fluoreszenz-Detektion während der PCR in Abwesenheit von DNA-Templat (NTC, no template control) von SYBR[®]-Gold und DNA-FIT-Sonde (**neu-E_{HP}**). Die Primer-Dimerisierung verursacht den Anstieg des SYBR[®]-Gold-Signals (schwarz) bei größerer Zyklenzahl (> 30), während die FIT-Sonde (grau) ein nahezu unverändertes, niedriges Fluoreszenzsignal lieferte.

Absorptions- und Emissionsspektren von TO-markierten *Neuraminidase*-Sonden

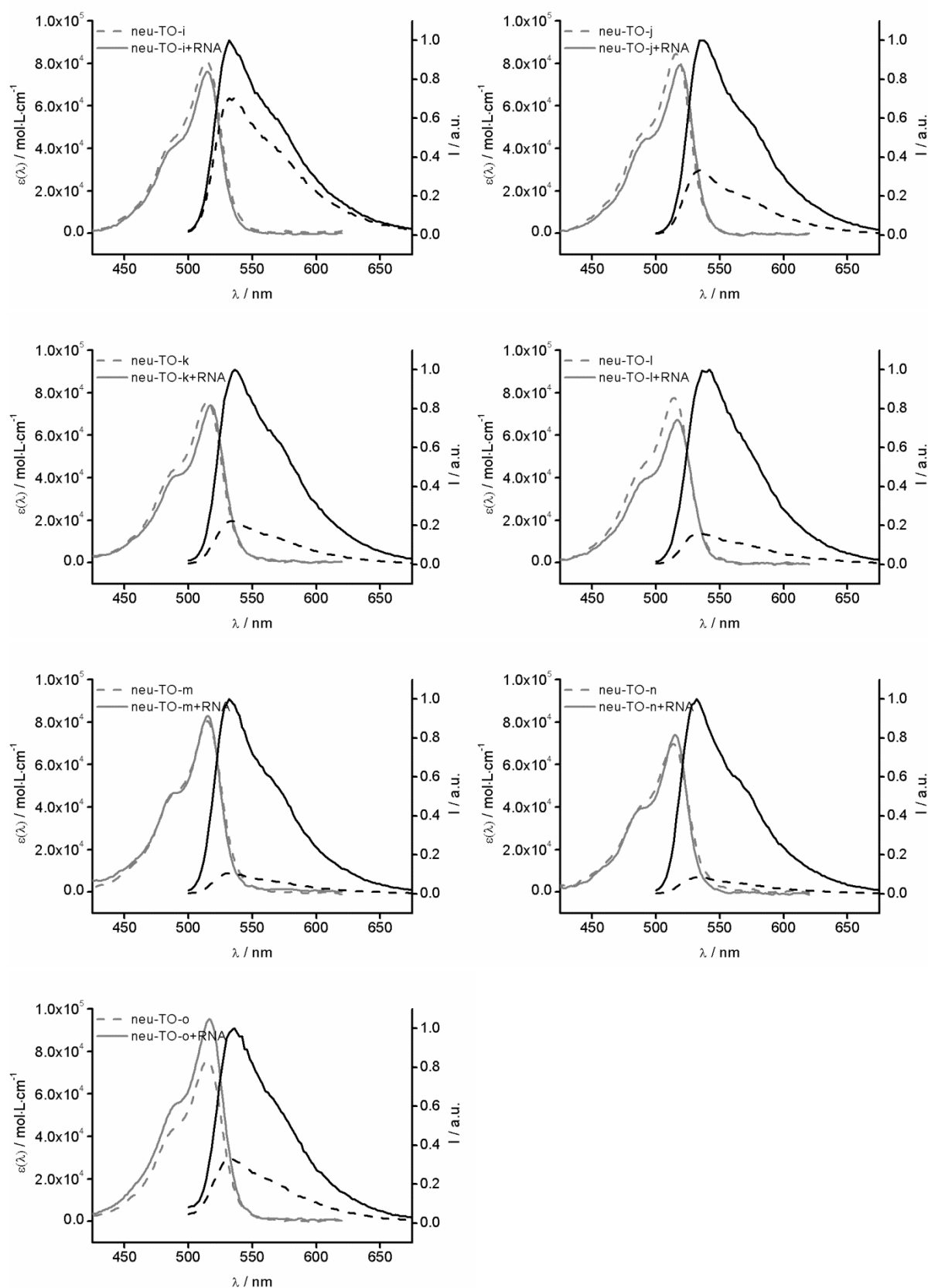
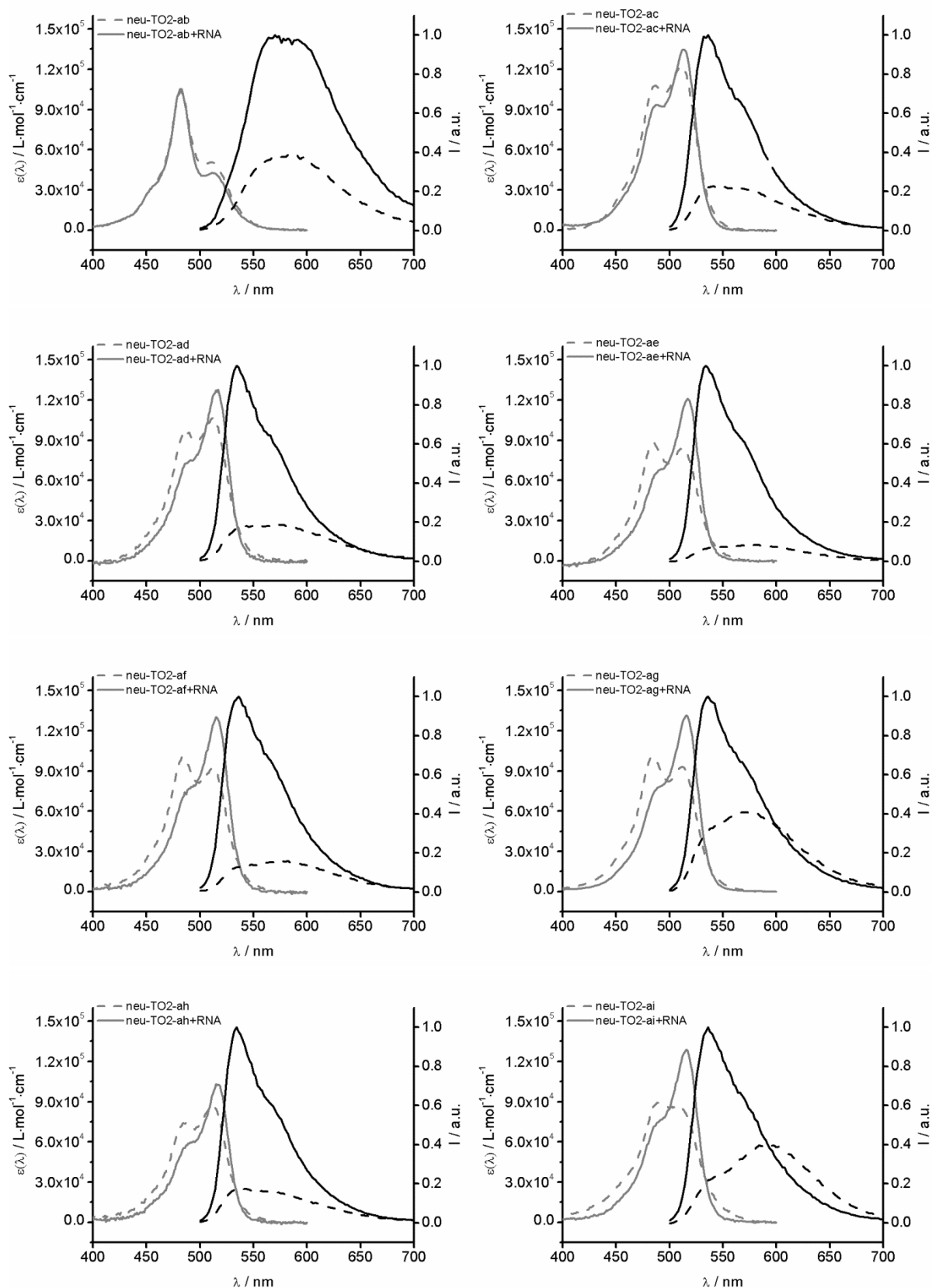


Abbildung 9.1.5: Absorption (grau) und Emission (schwarz) der entsprechenden Sonde vor (gestrichelt) und nach Hybridisierung mit komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 \AA q. **neu-RNA**, bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

9.2 Anhang zu Kapitel 4.3

Absorptions- und Emissionsspektren der TOTO-markierten Neuraminidase-Sonden



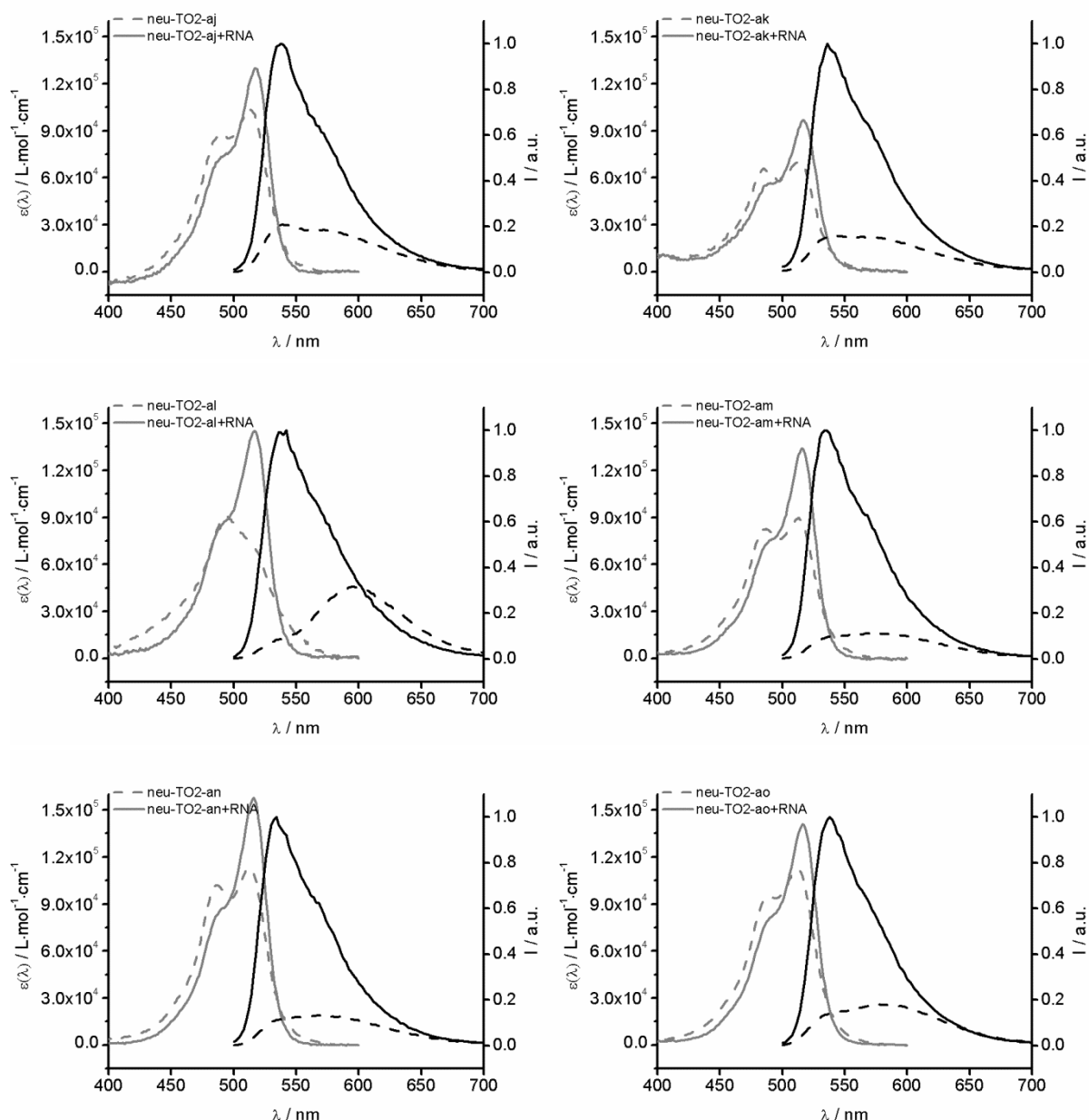
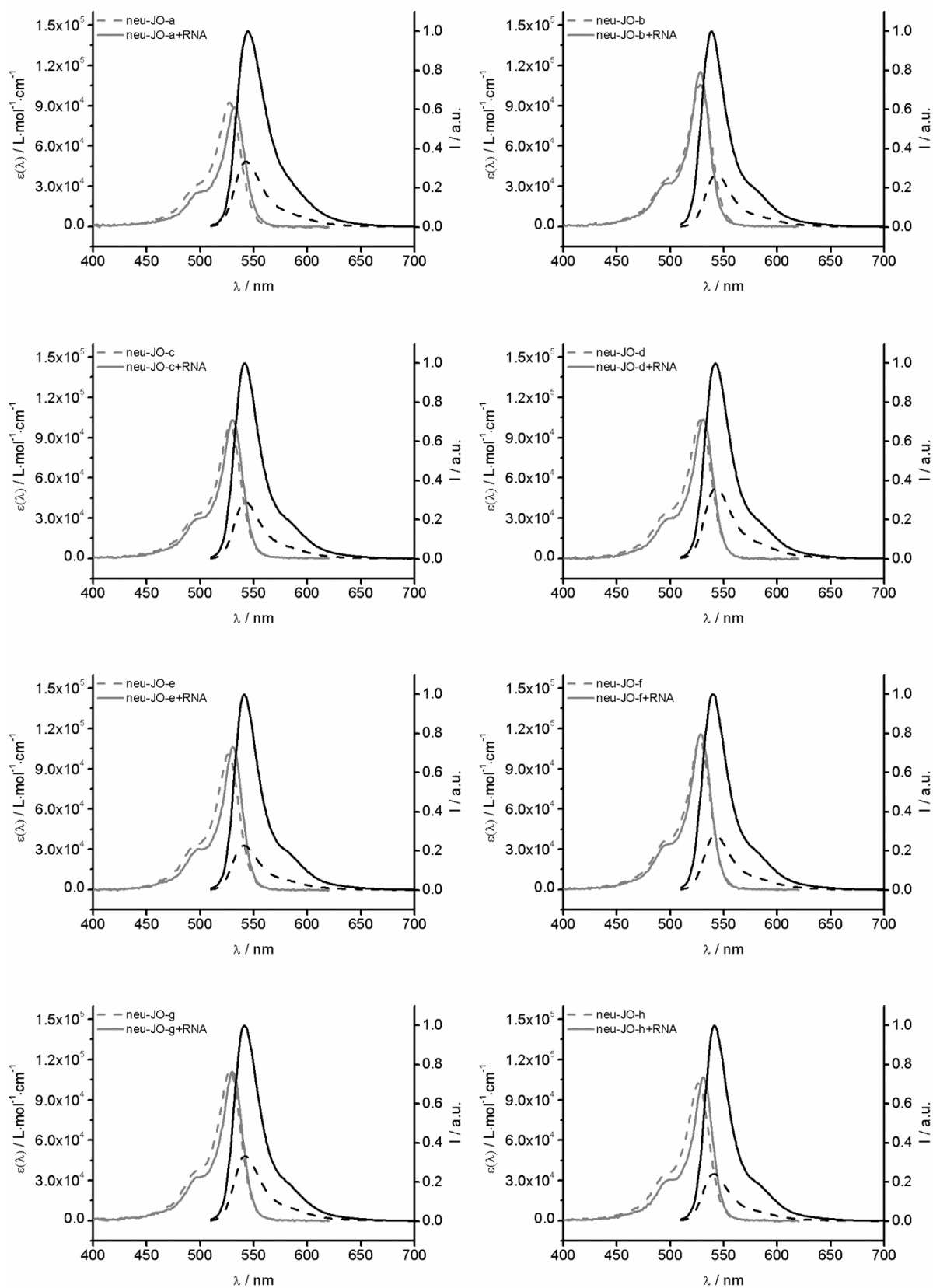


Abbildung 9.2.1: Absorption (grau) und Emission (schwarz) der entsprechenden Sonde vor (gestrichelt) und nach Hybridisierung mit komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. **neu-RNA**, bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Absorptions- und Emissionsspektren der JO-markierten *Neuraminidase*-Sonden

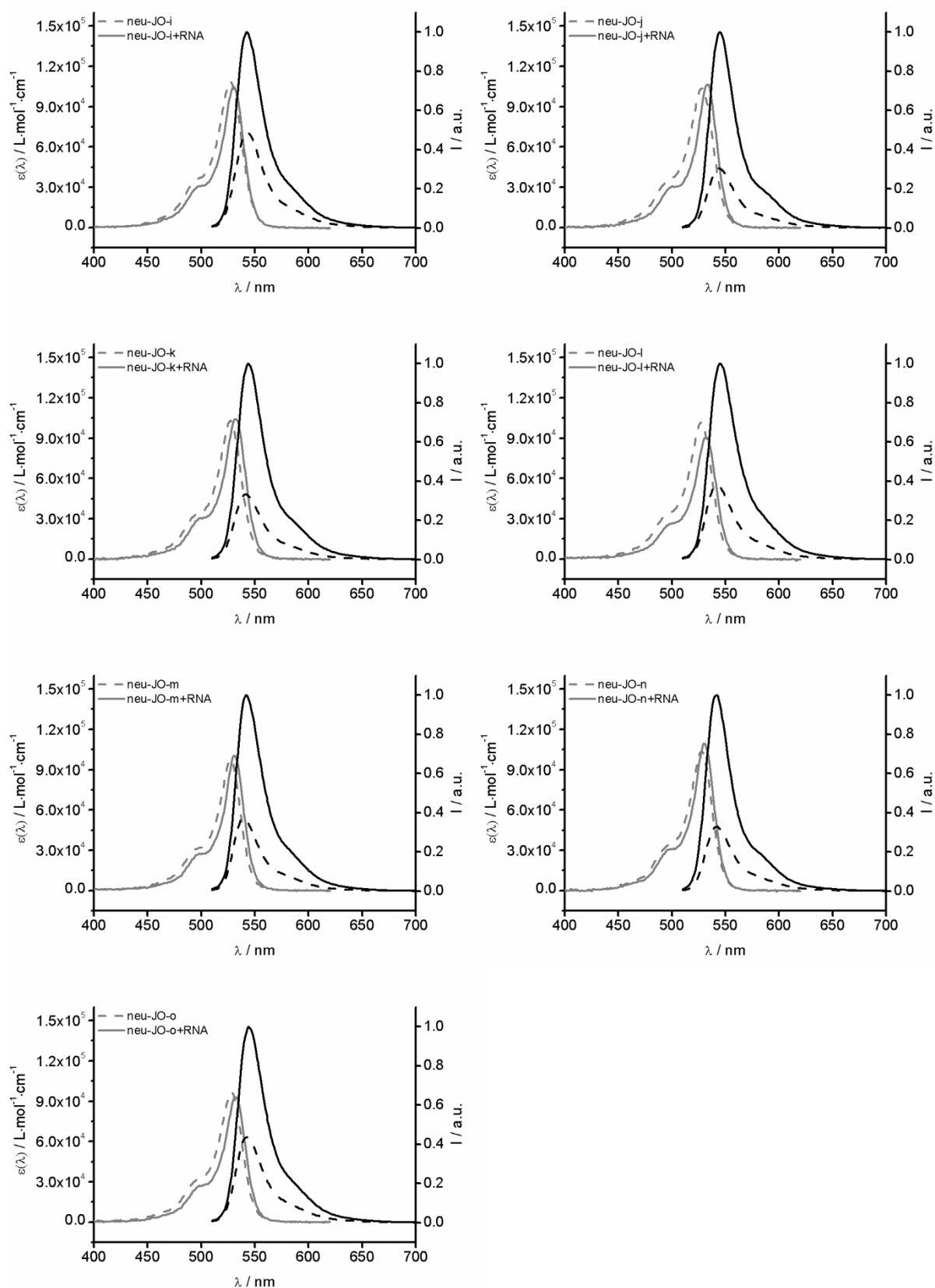
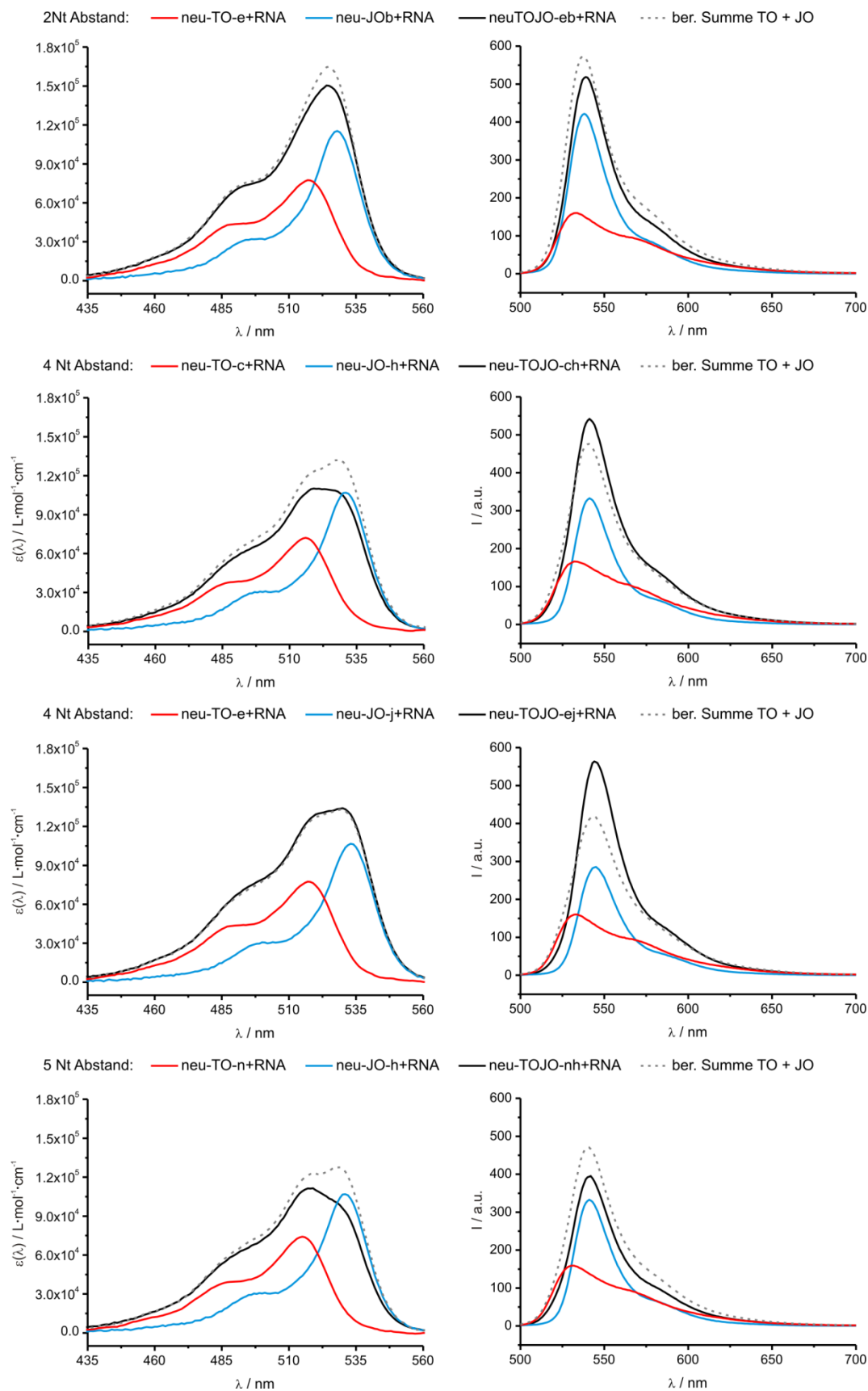


Abbildung 9.2.2: Absorption (grau) und Emission (schwarz) der entsprechende Sonde vor (gestrichelt) und nach Hybridisierung mit komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 510\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 $^{\circ}\text{C}$.

Vergleich der Absorptions- und Emissionsspektren von TO-, JO- und TOJO-markierten Neuraminidase-Sonden



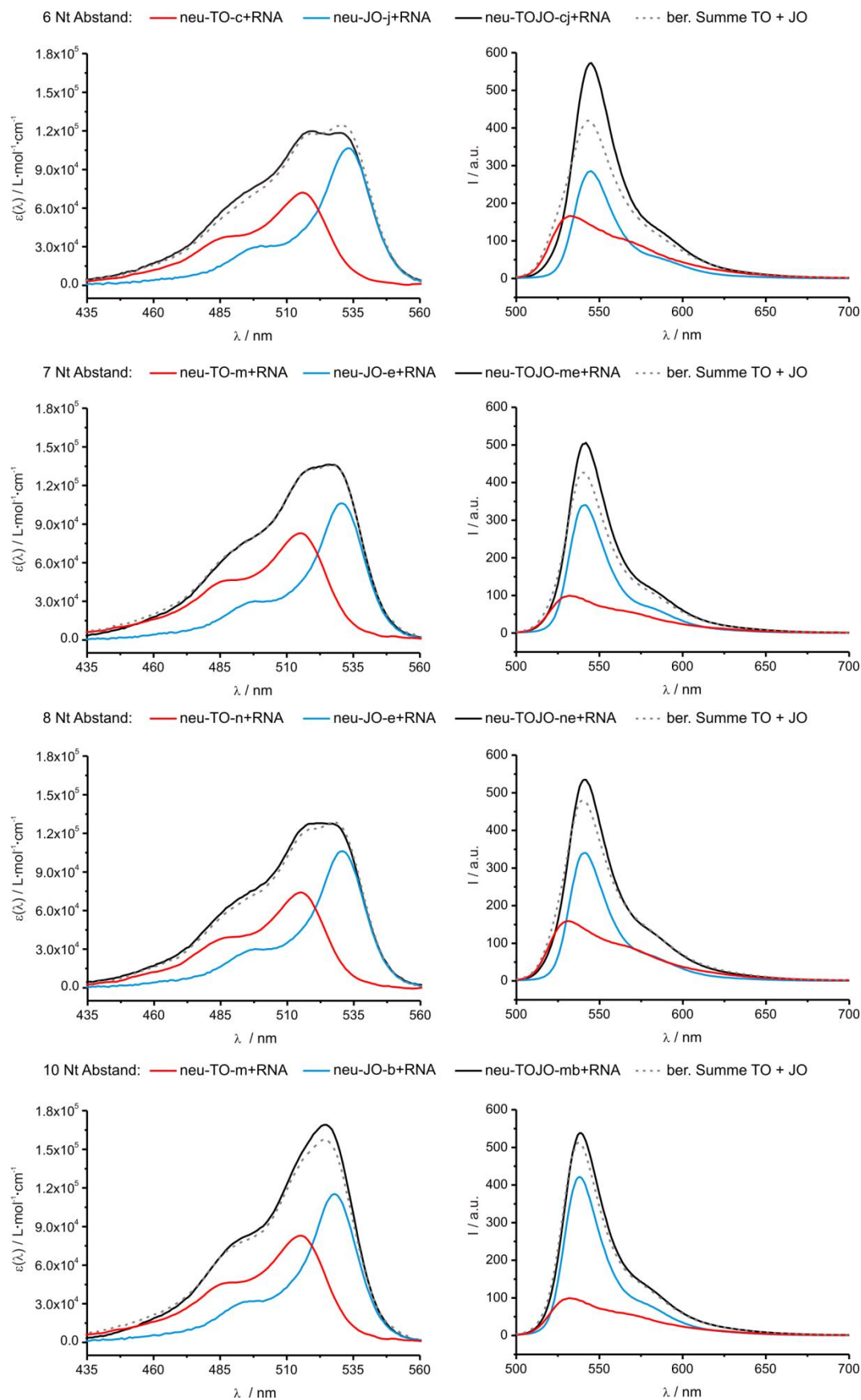


Abbildung 9.2.3: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der angegebenen Sonden (rot = TO, blau = JO, schwarz = TOJO) bzw. der berechneten Summe beider einfach-markierter Sonden (gestrichelt). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 \AA q. **neu-RNA**, bei Zugabe in PBS, $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em})$; slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 $^{\circ}\text{C}$.

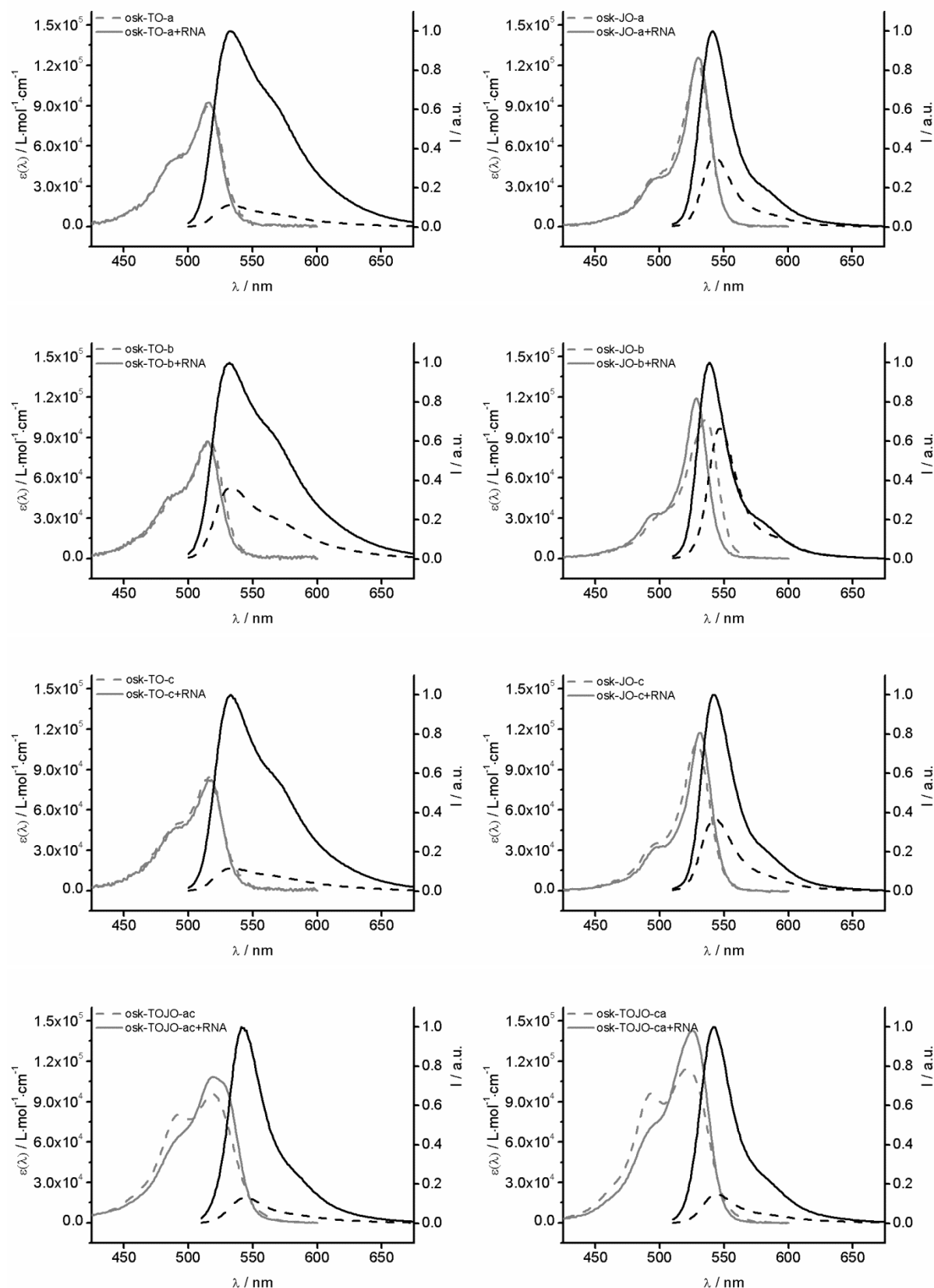
Absorptions- und Emissionsspektren der TO-, JO- und TOJO-markierten *Oskar*-Sonden

Abbildung 9.2.4: Absorption (grau) und Emission (schwarz) der entsprechenden Sonde vor (gestrichelt) und nach Hybridisierung mit komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. **neu-RNA**, bei Zugabe, in PBS; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$ JO und TOJO: $\lambda(\text{ex}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 510\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

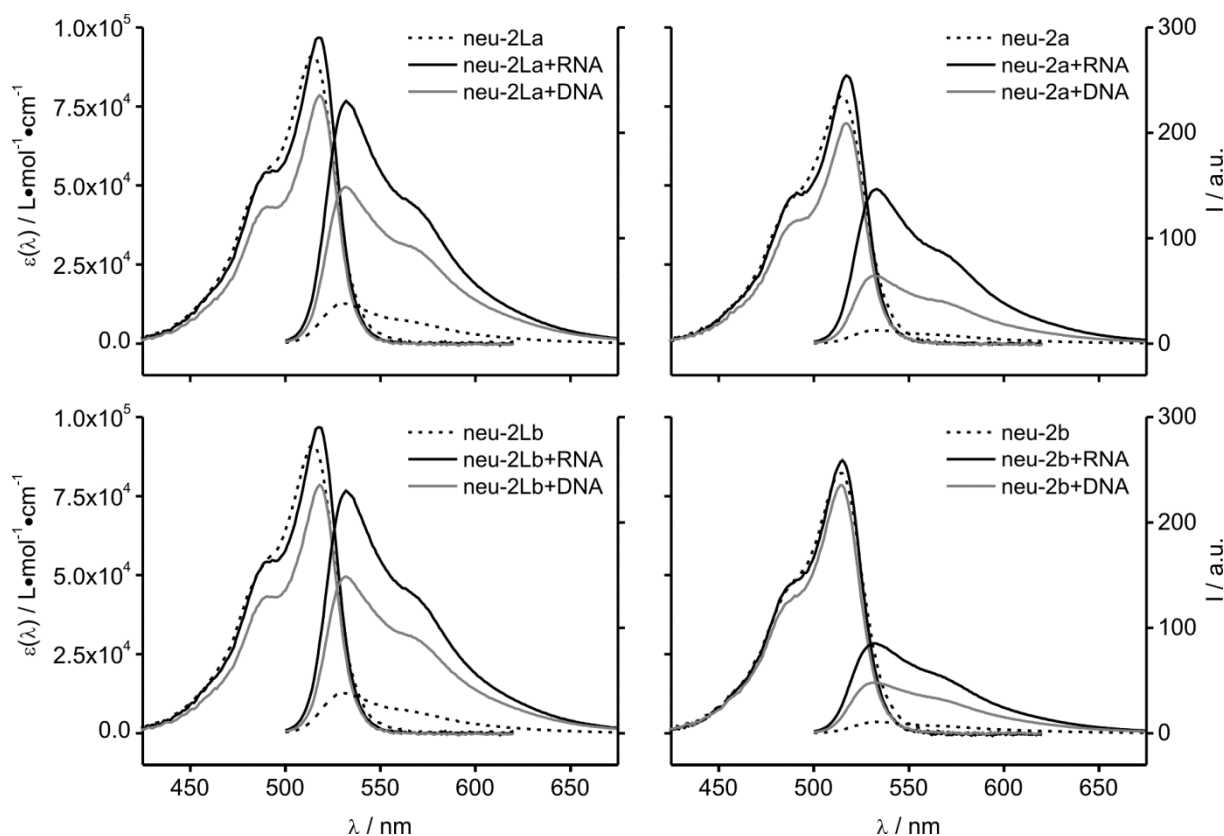
9.3 Anhang zu Kapitel 4.4

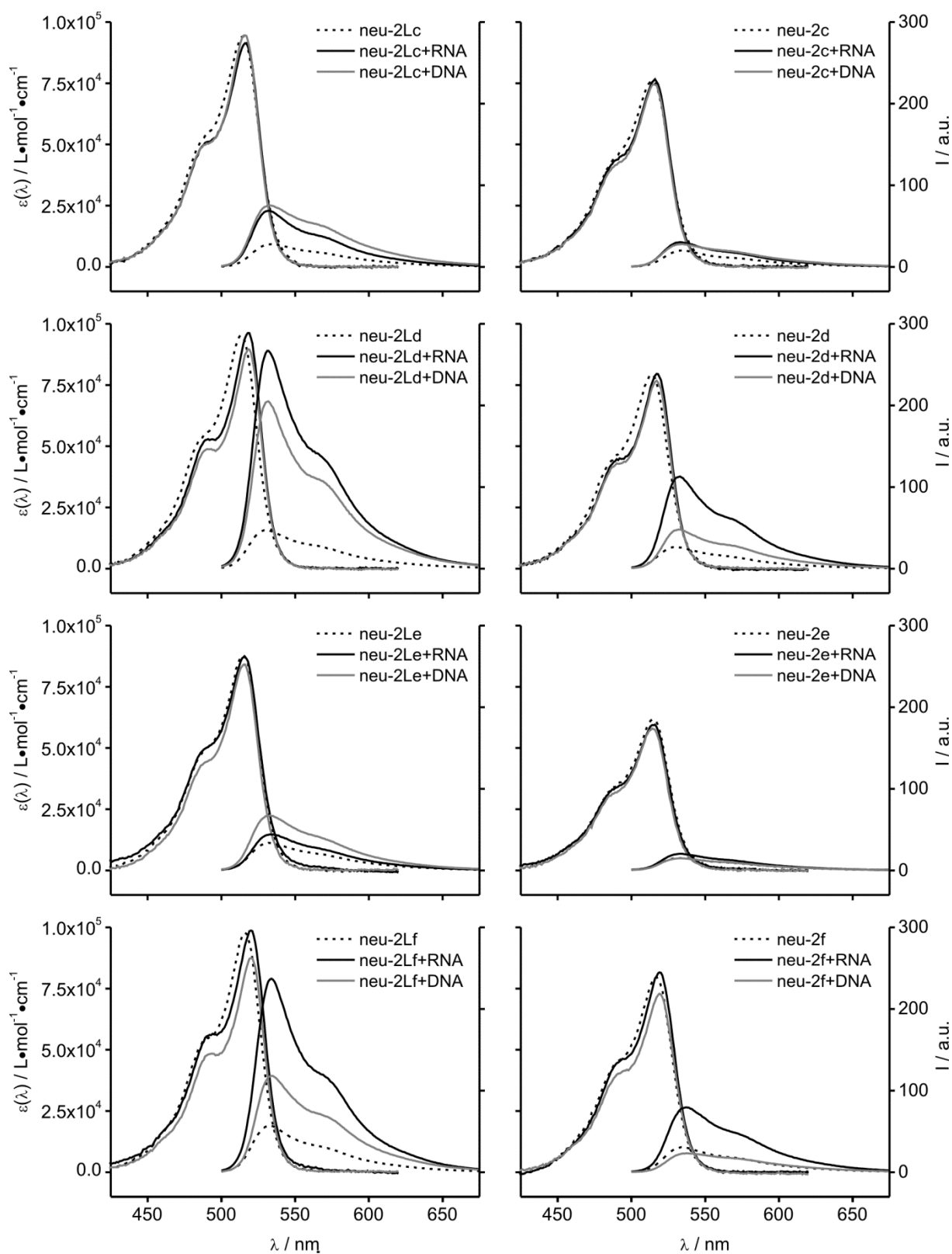
Tabelle 9.3.1: Fluoreszenzdaten der DNA- bzw. LNA-FIT-Sonden zur Detektion von *neuraminidase*-RNA.

Name	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	I_0	I	I/I_0	Φ_0	Φ	Φ/Φ_0	Br_0^b	Br^b
neu2a	CAGTT X TTATGCCGTTG	13	147	11.5	0.03	0.26	10.1	1.1	11.3
neu2b	CAGTTA X TATGCCGTTG	11	106	9.5	0.02	0.16	7.4	0.9	7.1
neu2c	CAGTTAT X ATGCCGTTG	20	30	1.5	0.04	0.06	1.6	1.6	2.4
neu2d	CAGTTATT X TGCCGTTG	26	113	4.4	0.05	0.20	4.0	2.1	8.2
neu2e	CAGTTATT A XGCCGTTG	15	20	1.4	0.03	0.04	1.3	1.3	1.7
neu2f	CAGTTATTAT X CCGTTG	30	77	2.5	0.05	0.11	2.5	2.5	6.4
neu2g	CAGTTATTATG X CGTTG	19	100	5.2	0.03	0.17	5.4	1.6	8.5
neu2h	CAGTTATTATGC X GTTG	8	49	6.0	0.02	0.09	5.7	0.8	4.2
neu2La	CAGTT X T _L TATGCCGTTG	37	228	6.1	0.06	0.34	5.9	2.9	17.2
neu2Lb	CAGTTA X T _L ATGCCGTTG	13	168	13.1	0.02	0.27	12.0	1.1	13.8
neu2Lc	CAGTTAT X A _L TGCCGTTG	28	69	2.5	0.05	0.11	2.3	2.4	5.1
neu2Ld	CAGTTATT X T _L GCCGTTG	46	265	5.7	0.07	0.38	5.2	3.8	18.4
neu2Le	CAGTTATT A X _L CCGTTG	34	44	1.3	0.06	0.07	1.3	2.8	3.5
neu2Lf	CAGTTATTAT X C _L CGTTG	57	236	4.2	0.09	0.33	3.8	4.4	16.1
neu2Lg	CAGTTATTATG X C _L GTTG	91	295	3.2	0.14	0.44	3.3	6.5	21.0
neu2Lh	CAGTTATTATGC X G _L TTG	12	78	6.4	0.02	0.16	6.5	1.1	6.4

[a] tiefgestelltes „L“ LNA markiert LNA-Nukleotide; [b] Br_0 = Helligkeit im Einzelstrang, Br = Helligkeit im Doppelstrang, in $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Vergleich der Absorption und Emission von DNA und LNA-FIT Sonden bei Hybridisierung mit Ziel-DNA und Ziel-RNA





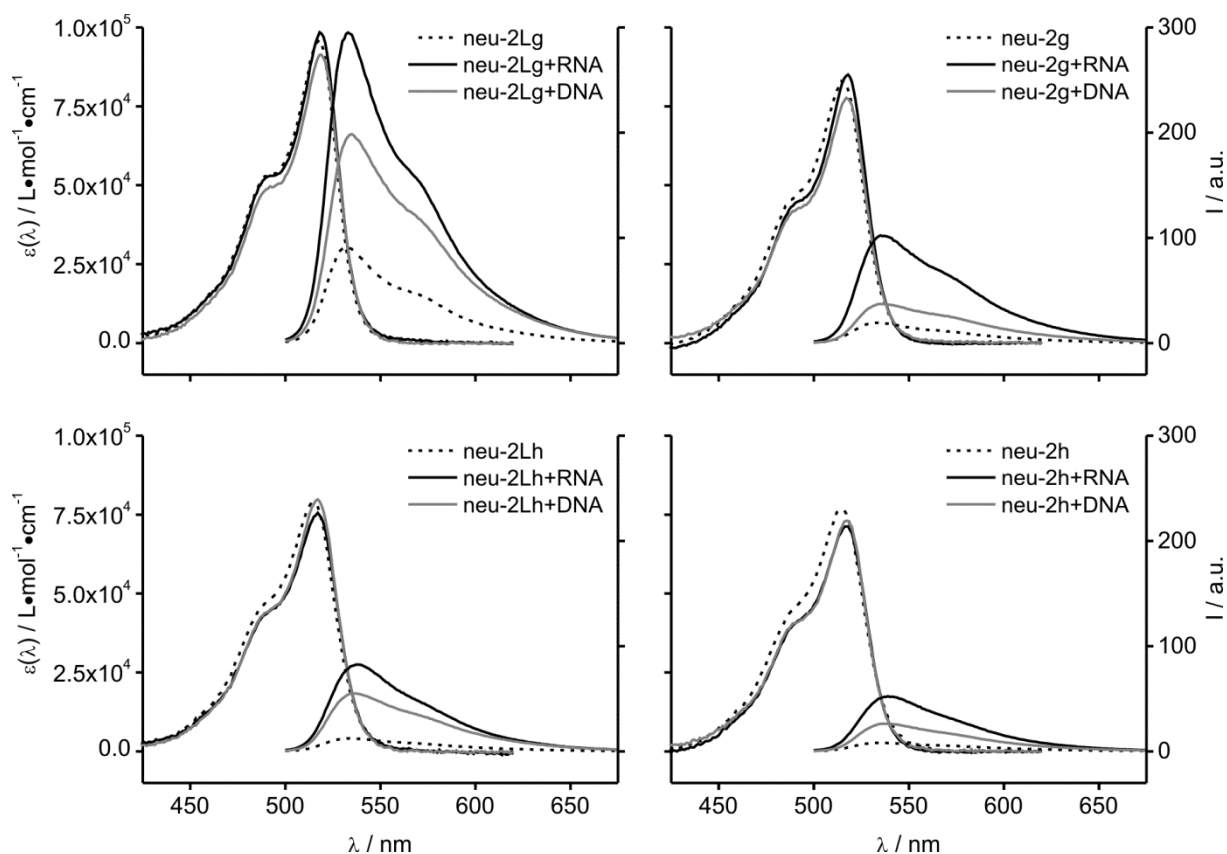


Abbildung 9.3.1: Vergleich von LNA (links) und DNA (rechts) FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer DNA (grau) bzw. RNA (schwarz). Das Absorptionsspektrum ist jeweils links, das Emissionsspektrum ist jeweils rechts gezeigt. Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA bzw. -DNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Exemplarische Messdaten zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer.

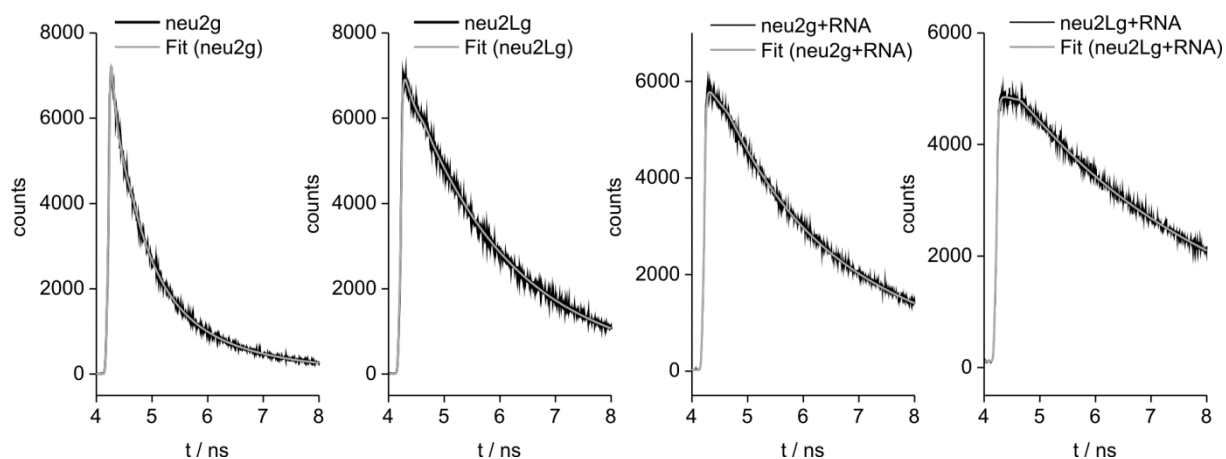


Abbildung 9.3.2: Die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten wurden von Dr. Eugeny Ermilov (AG Röder, HU-Berlin) durchgeführt. Messung der Fluoreszenzlebensdauer (schwarz) und exponentielle Regression (grau).

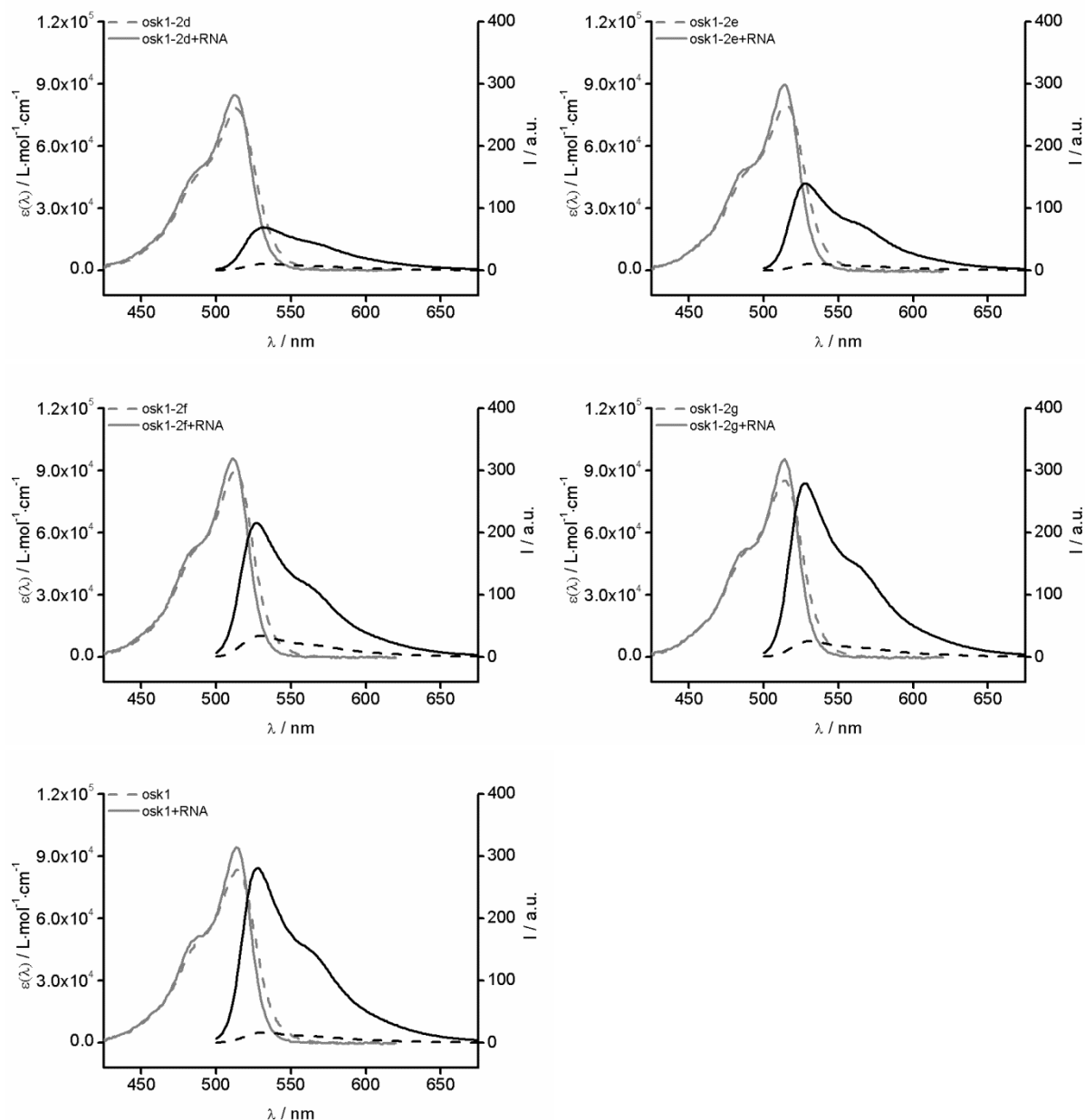
Absorptions- und Emissionsspektren der Optimierung zur Nuklease-Resistenz von *osk1*

Abbildung 9.3.3: Vergleich unterschiedlicher LNA- und 2'-O-Me-modifizierter FIT-Sonden (siehe Tabelle 4.4.5) in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Das Absorptionsspektrum (grau) ist jeweils links, das Emissionsspektrum (schwarz) ist jeweils rechts gezeigt. Bedingungen: 0,5 μM Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA bzw. -DNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

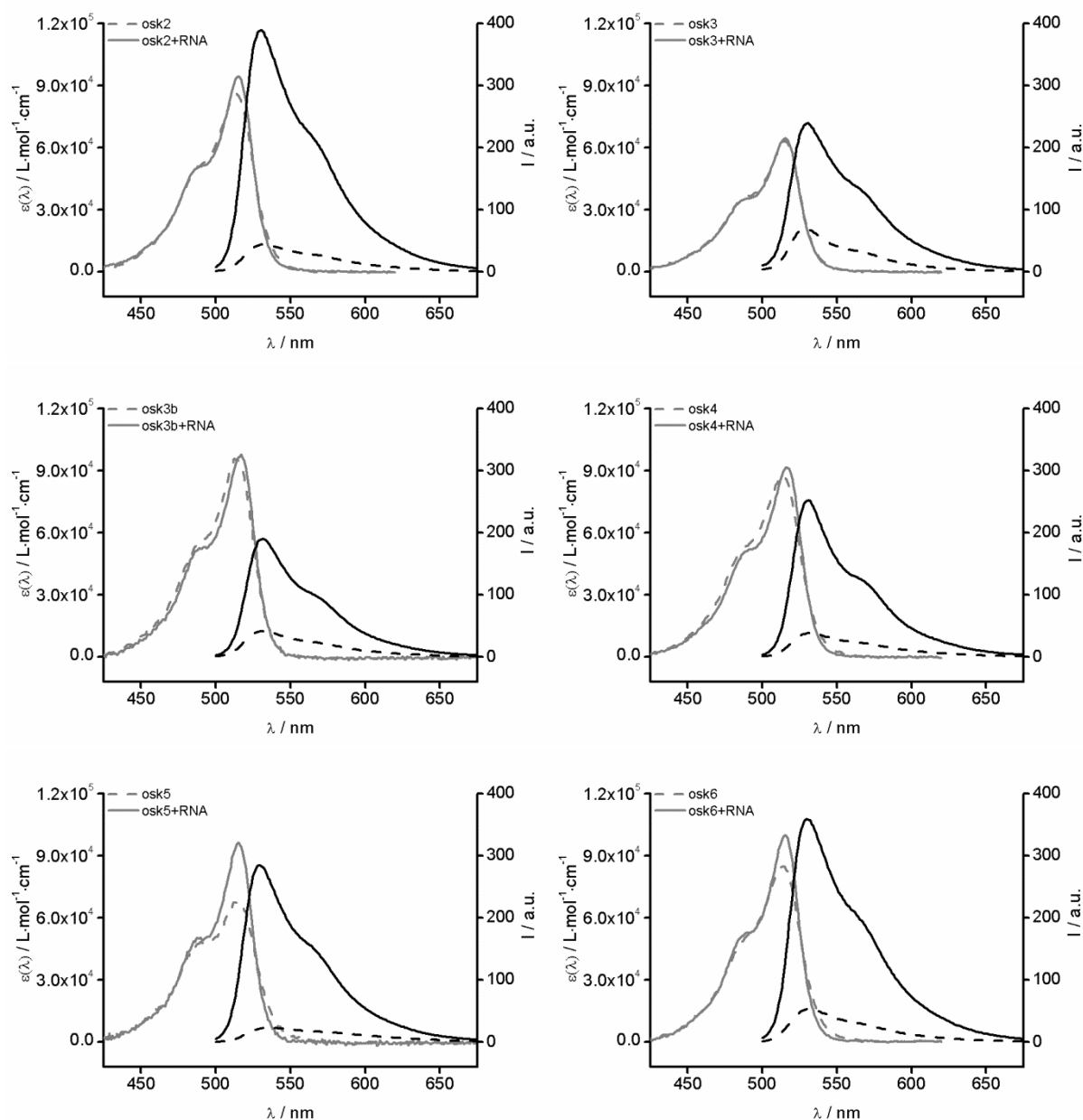
Absorptions- und Emissionsspektren der weiteren Nuklease-resistenten *Oskar*-Sonden

Abbildung 9.3.4: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der 1 Nt-Abstand Sonden (siehe Tabelle 4.4.4) in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

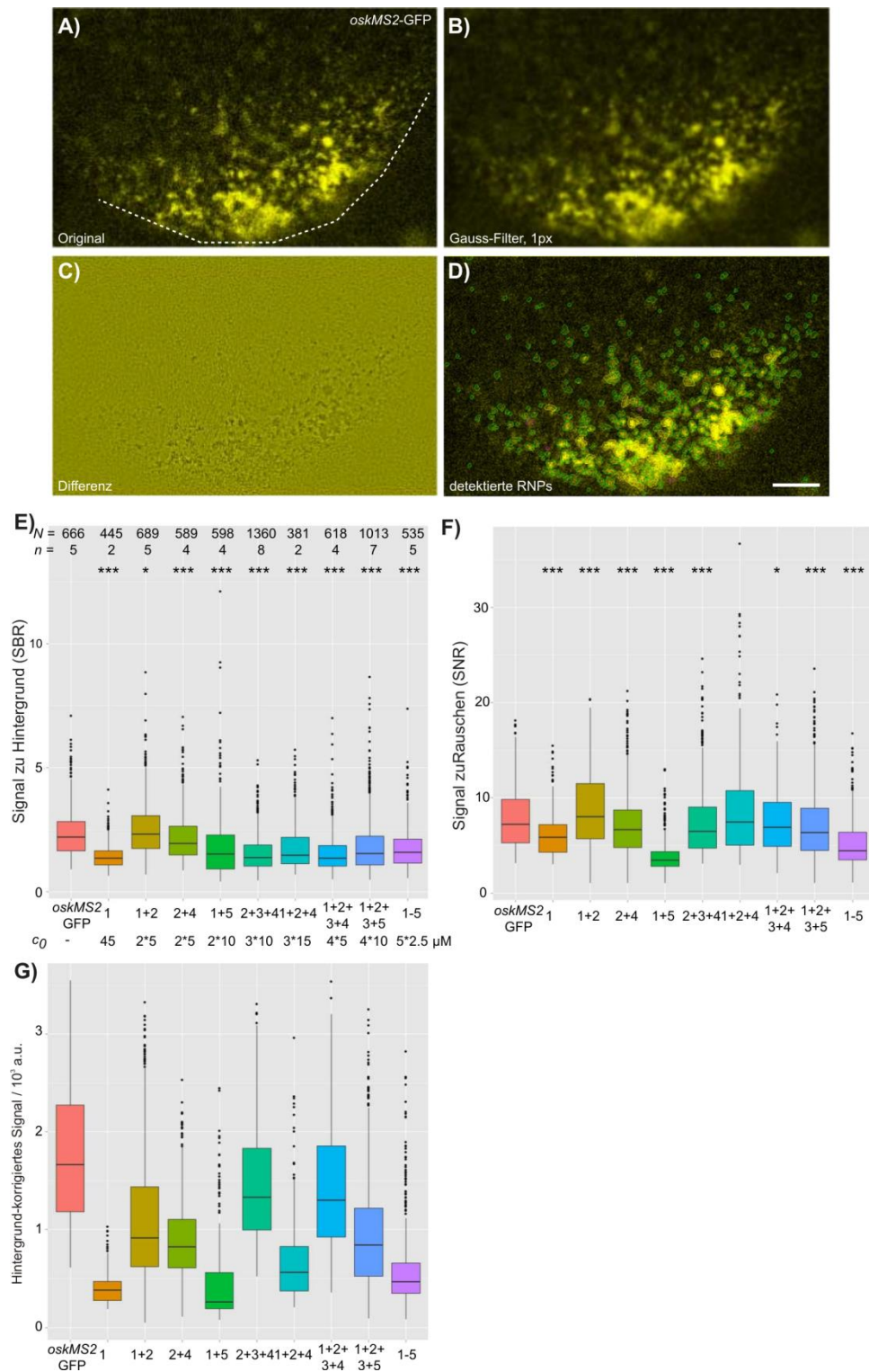
Detektion von *Oskar*-Ribonukleotid-Partikeln

Abbildung 9.3.5: Die Fluoreszenzmikroskopie und Analyse der Daten wurden von Dr. Imre Gaspar (AG Ephrussi, EMBL-Heidelberg) durchgeführt. Kontrast und Helligkeit der *Oskar*-RNP-Detektion durch FIT-Sonden. Roh-Abbildung (A) und Rausch-Unterdrückung mittels Gauss-Filter (B). Das Rauschen ergibt sich aus der Differenz (C) der Abbildungen A und B; Grüne Markierungen (D) entsprechen den detektierten RNPs. E-G) optische Parameter der detektierten RNPs. Die Detektion von FIT-Sonden erfolgte bei $\lambda(\text{ex}) = 514 \text{ nm}$, die Detektion von MS2-GFP bei $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$. * und *** geben $p < 0.05$ bzw. $p < 0.001$ eines paarweisen Mann-Whitney-Test (Homogenitätstest) gegenüber der Kontrolle (MS2-GFP) an. N = Anzahl analysierter RNPs, n = Anzahl der untersuchten Videos, c_0 = Konzentration der injizierten Sonde(n). Die Skala in Abb. D repräsentiert $5 \mu\text{m}$.

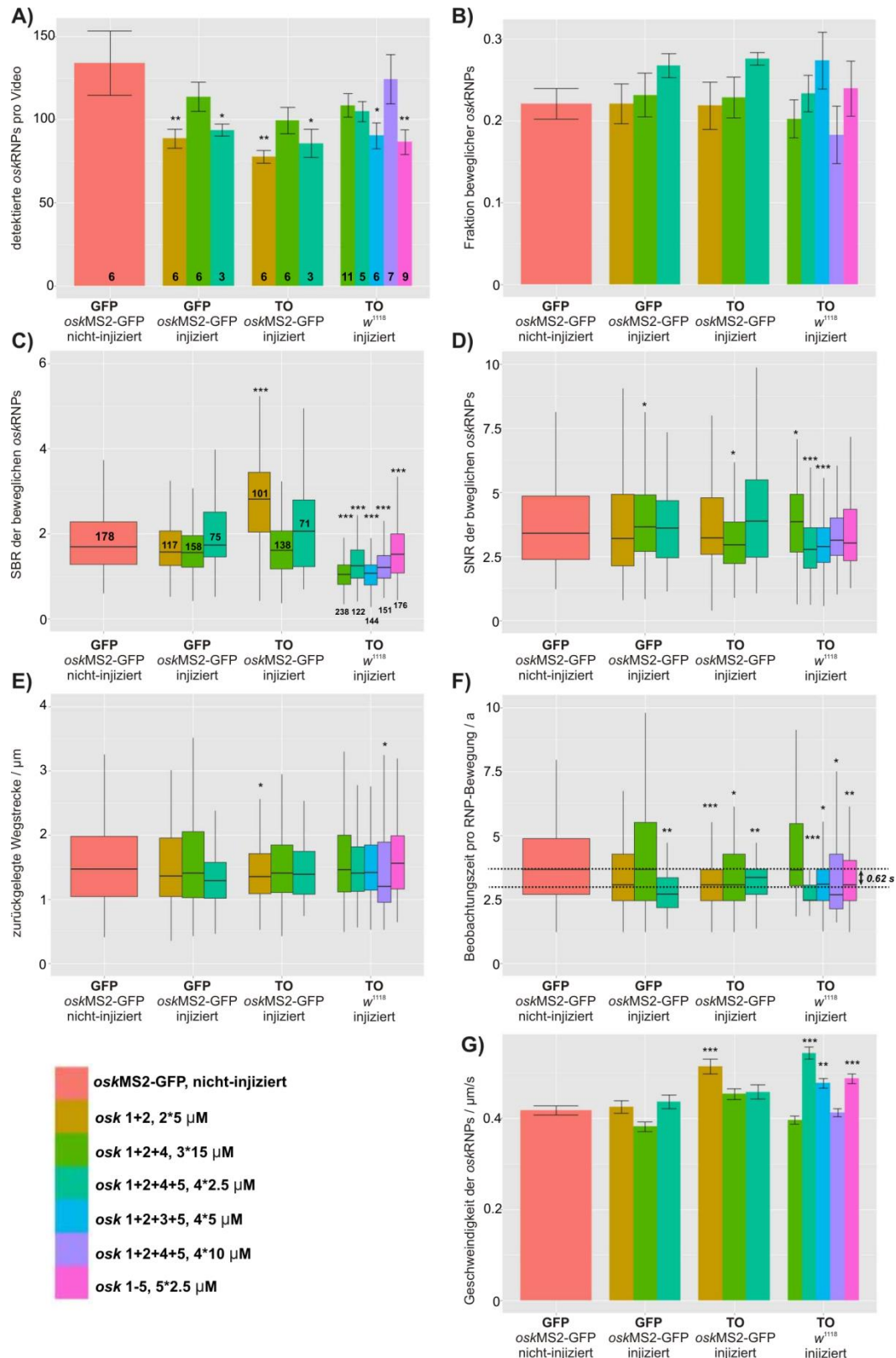
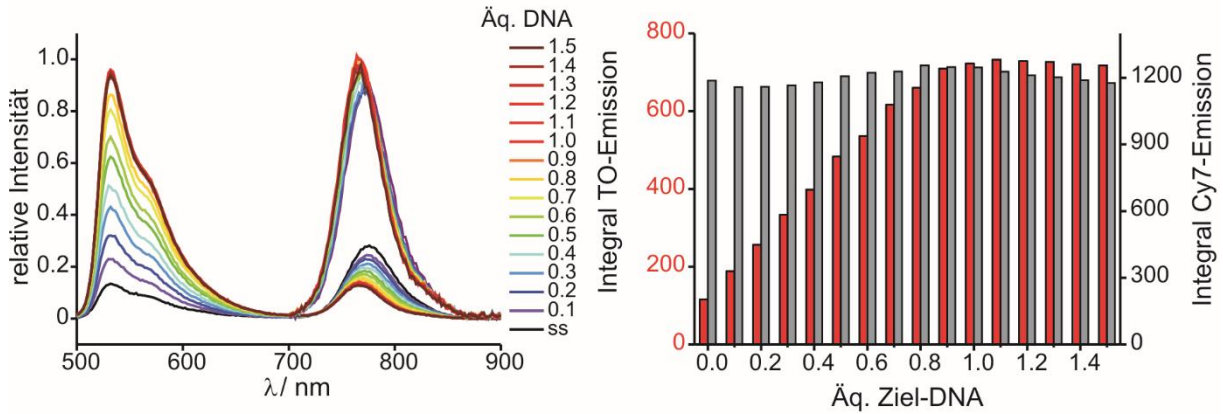


Abbildung 9.3.6: Die Fluoreszenzmikroskopie und Analyse der Daten wurden von Dr. Imre Gaspar (AG Ephrussi, EMBL-Heidelberg) durchgeführt. Optische Eigenschaften und Beweglichkeit der *oskRNPs* während der computergestützten Partikel-Analyse. *, ** bzw. *** geben $p < 0.05$, $p < 0.01$ bzw. $p < 0.001$ des Homogenitätstests gegenüber dem *oskMS2*-GFP-System an.

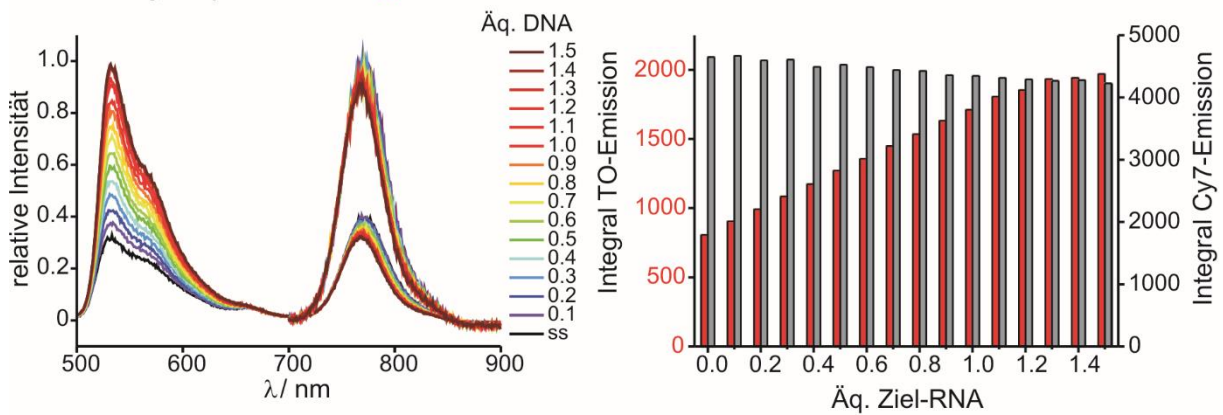
9.4 Anhang zu Kapitel 4.5

Fluoreszenzemission von qFIT-Sonden bei schrittweiser Zugabe von komplementärer DNA bzw. RNA.

B-Raf-V600E: Cy7-Bu-TCGAGATTTCG**X**TGTAGCTAG Ziel-DNA: CTAGCTACAGCGAAATCTCGA



osk-a-Bu-Cy7: Cy7-Bu-GACTT**X**AGATAATAGGTTTTGGCG



osk-b-Bu-Cy7: Cy7-Bu-GACTTAAGATA**X**TAGGTTTTGGCG

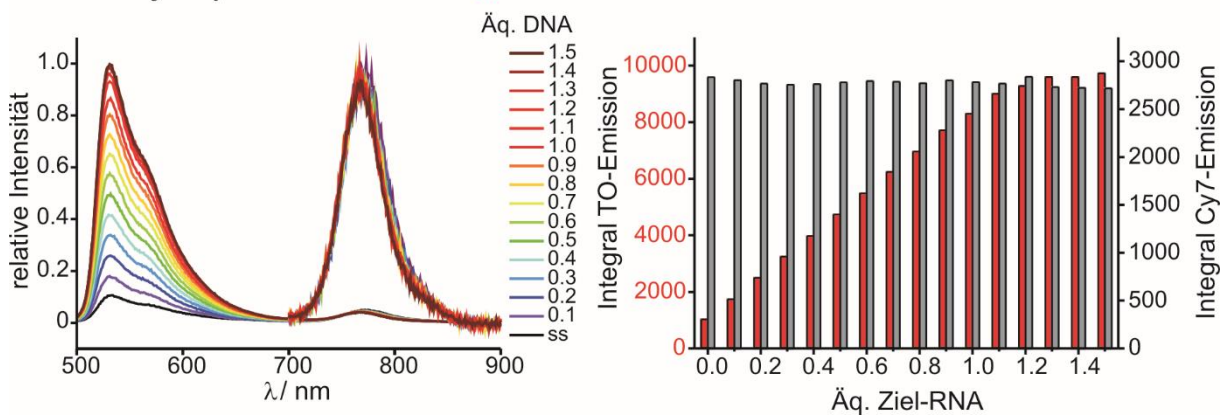


Abbildung 9.4.1: Titrationsexperimente der angegebenen Sonden. Emissionspektren von TO und Cy7 bei schrittweiser Zugabe von und Ziel-Nukleinsäure (links); Integrale der Fluoreszenzemission von TO (rot) und Cy7 (grau) (rechts). Bedingungen: 200 pmol **osk-a-Bu-Cy7** und **osk-b-Bu-Cy7**; 20 pmol **B-RafV600E** in PBS, Zugabe von Ziel-RNA (CGCCAAACCUAAUUAUCUUAAGUC) in 0.1 Äq. Schritten (20 bzw. 2 pmol), im Bereich: 0.0-1.5 Äq.; TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}900 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda(\text{ex}) = 690 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 700\text{-}900 \text{ nm}$.

Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der RNA-Konzentration mittels qFIT-Sonden

Die unterschiedlichen Methoden zur Berechnung der Konzentration zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der erhaltenen Konzentrationen. Bei Berechnung anhand der externen Kalibrierung und ohne Einbeziehung der Fluoreszenzlebensdauer (A-A'') wird die Konzentration der gebundenen Sonde unterbewertet, während ungebundene Sonde überwertet wird. Durch die interne Kalibrierung der molaren Fluoreszenz verringert sich der Anteil ungebundener Sonde (B-B''). Die adaptive Bestimmung der molaren Fluoreszenz pro Pixel (C-C'') resultiert in einer Reduzierung des unspezifischen Signals, z.B. in den Follikelzellen, wo Oskar in der Regel nicht vorkommt (gelbe Pfeile).

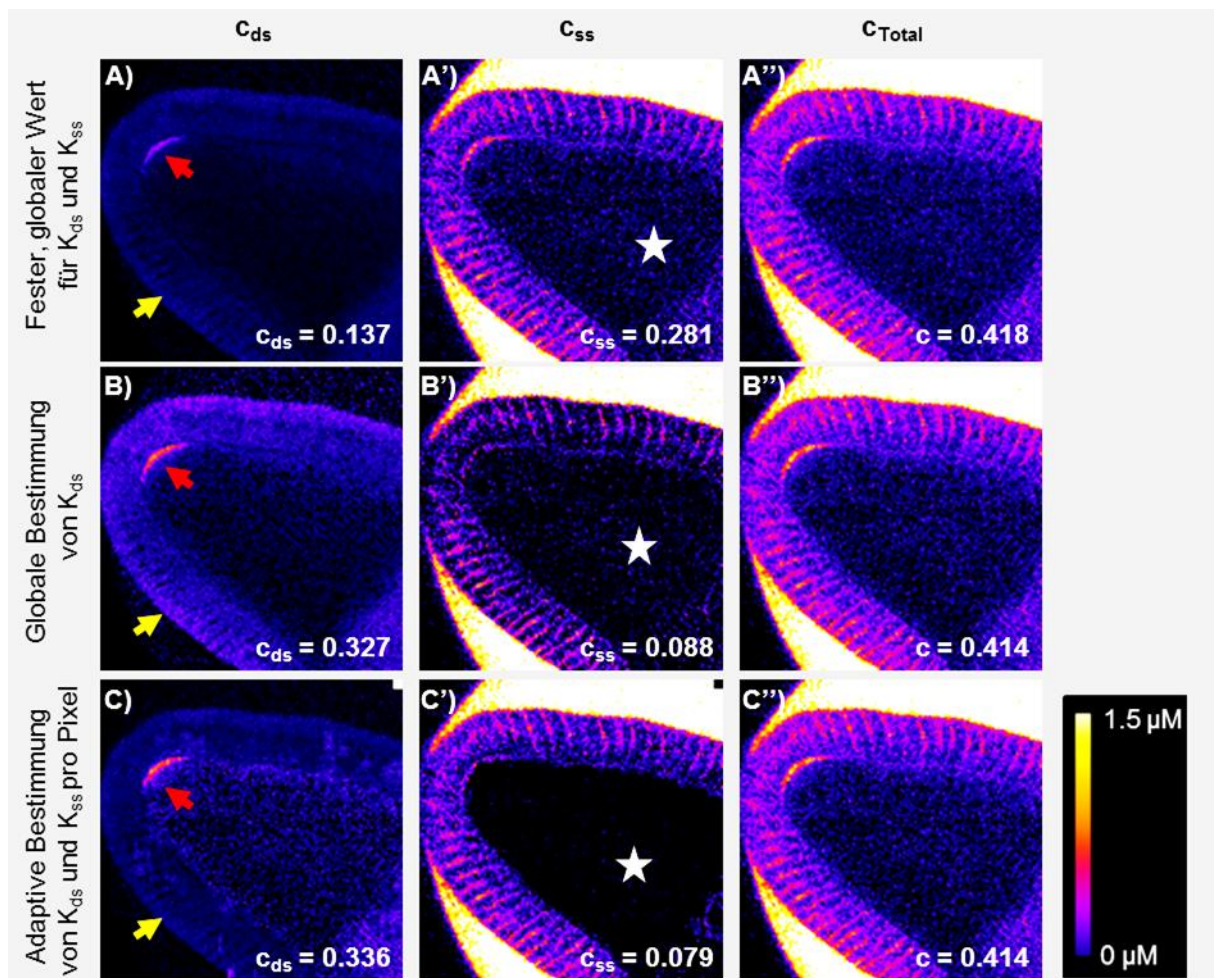
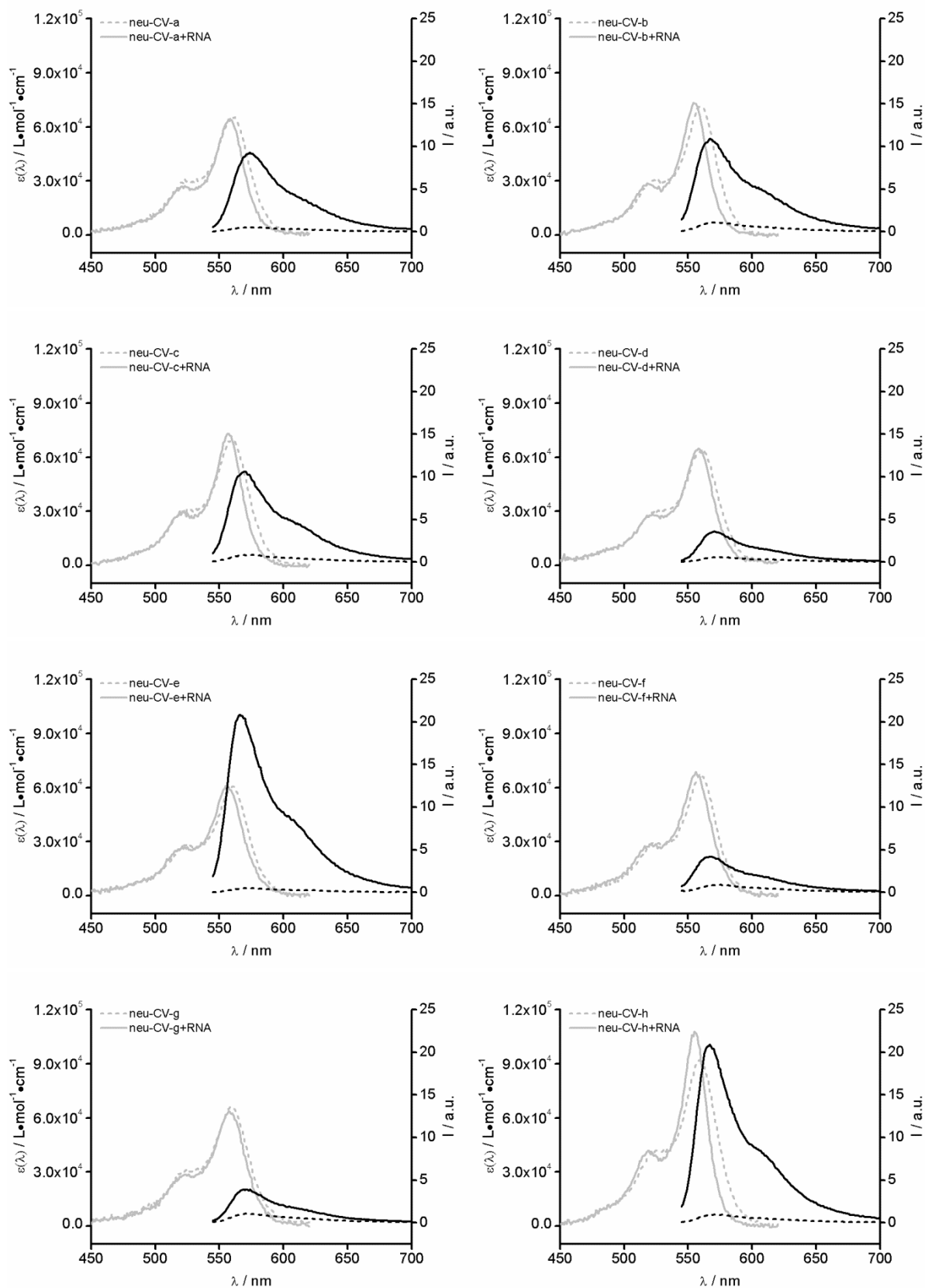


Abbildung 9.4.2: Die Fluoreszenzmikroskopie und Analyse der Daten wurden von Dr. Imre Gaspar (AG Ephrussi, EMBL-Heidelberg) durchgeführt. Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Konzentration. Rote Pfeile: Sonde und Oskar-RNA am posterioren Pol; gelbe Pfeile: Hintergrundsignal in den Follikelzellen; Stern: ungebundene Sonde im Ooplasma.

9.5 Anhang zu Kapitel 4.6

Absorptions- und Emissionspektren der CV-markierten *Neuraminidase*-Sonden

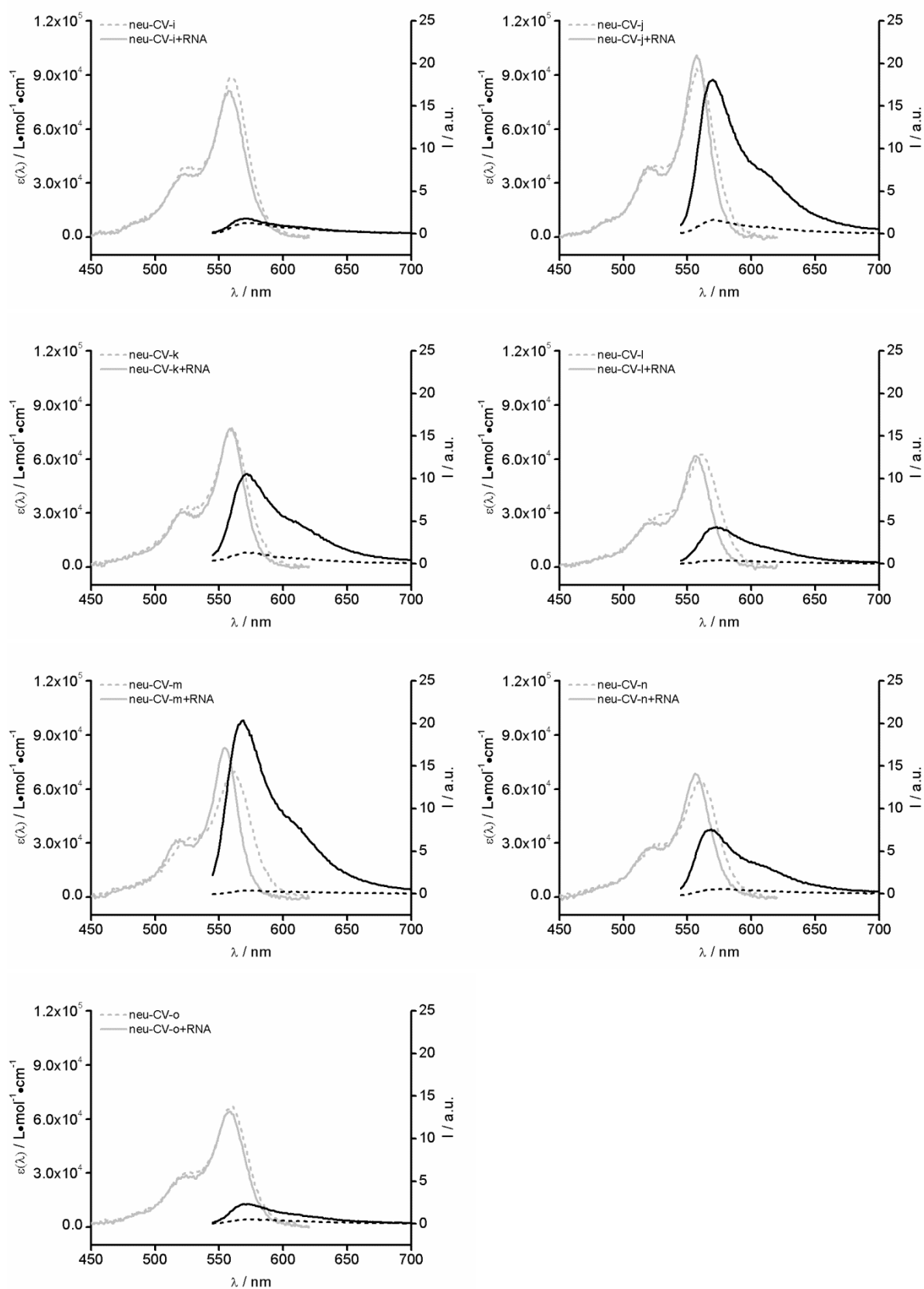
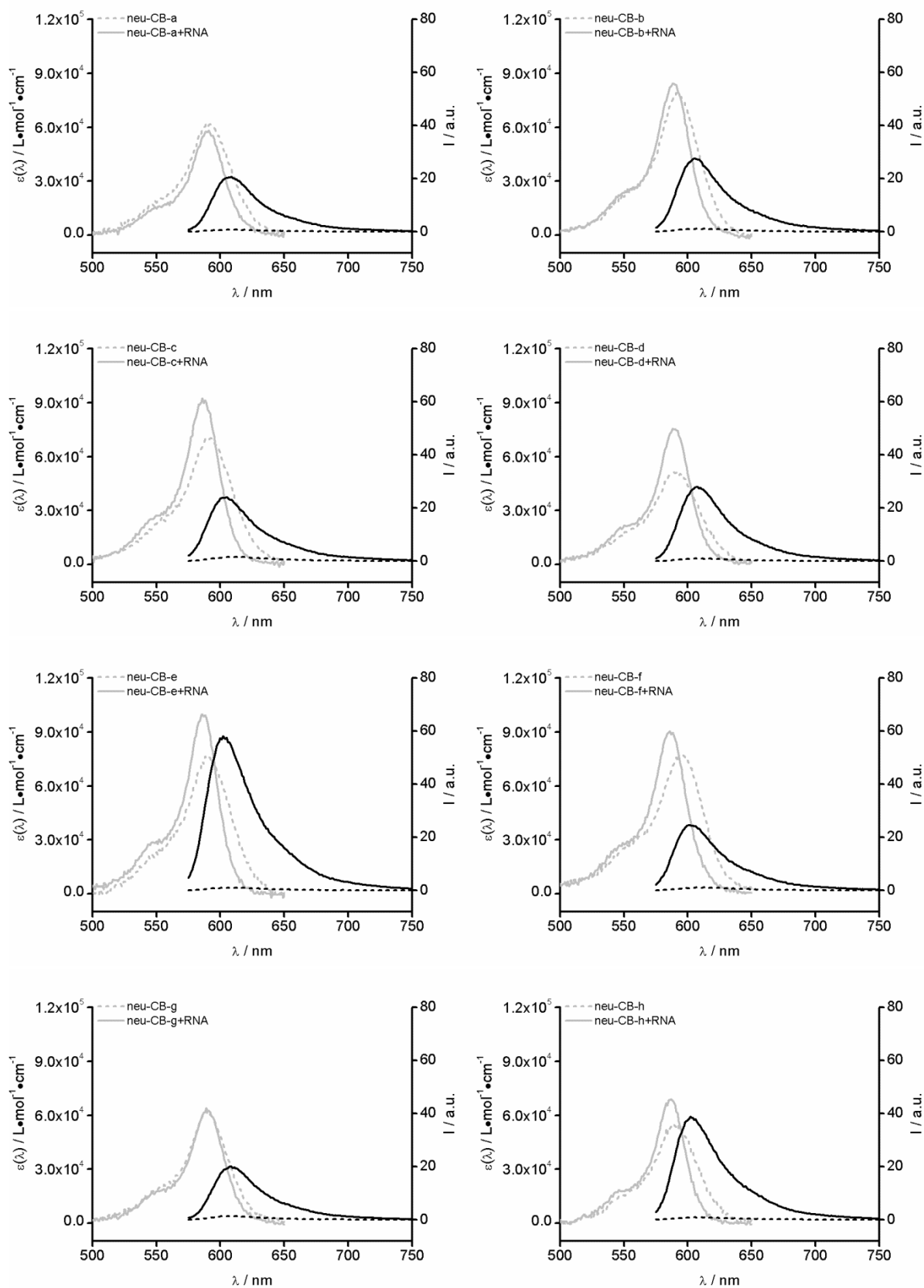


Abbildung 9.5.1: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der CV-markierten *Neuraminidase*-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0,5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 530 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 545\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Absorptions- und Emissionspektren der CB-markierten *Neuraminidase*-Sonden

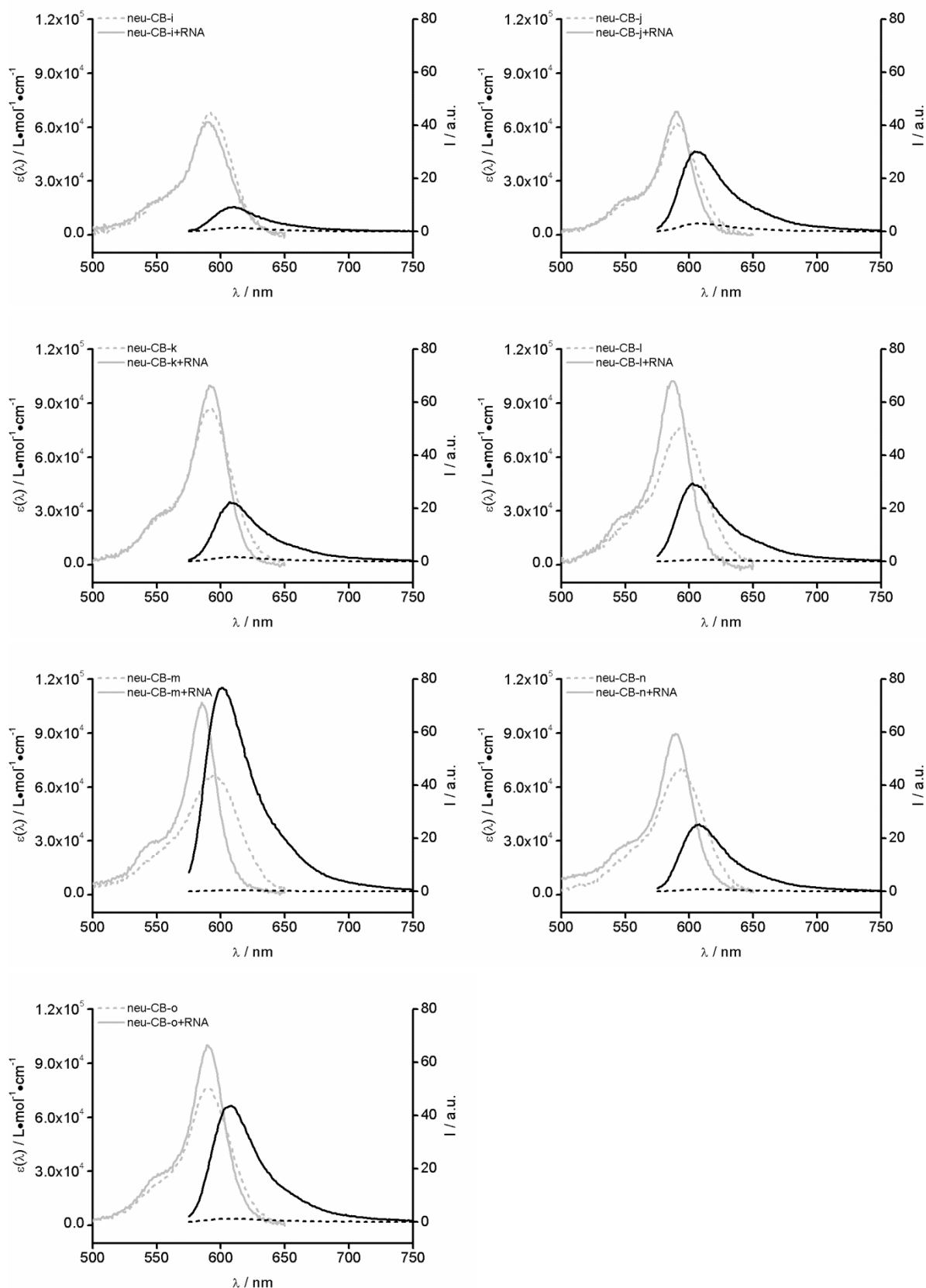
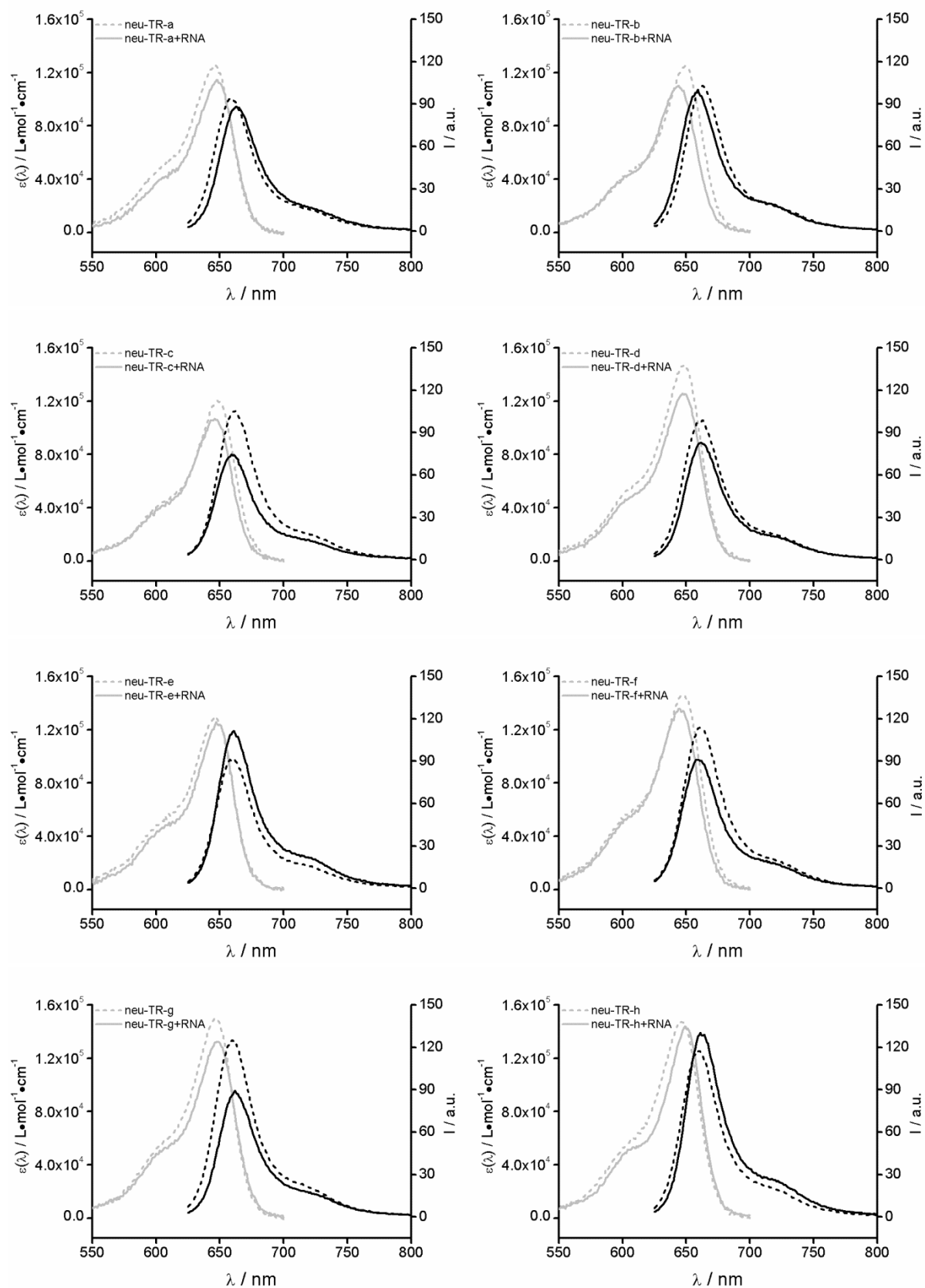


Abbildung 9.5.2: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der CB-markierten *Neuraminidase*-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}750 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Absorptions- und Emissionspektren der TR-markierten *Neuraminidase*-Sonden

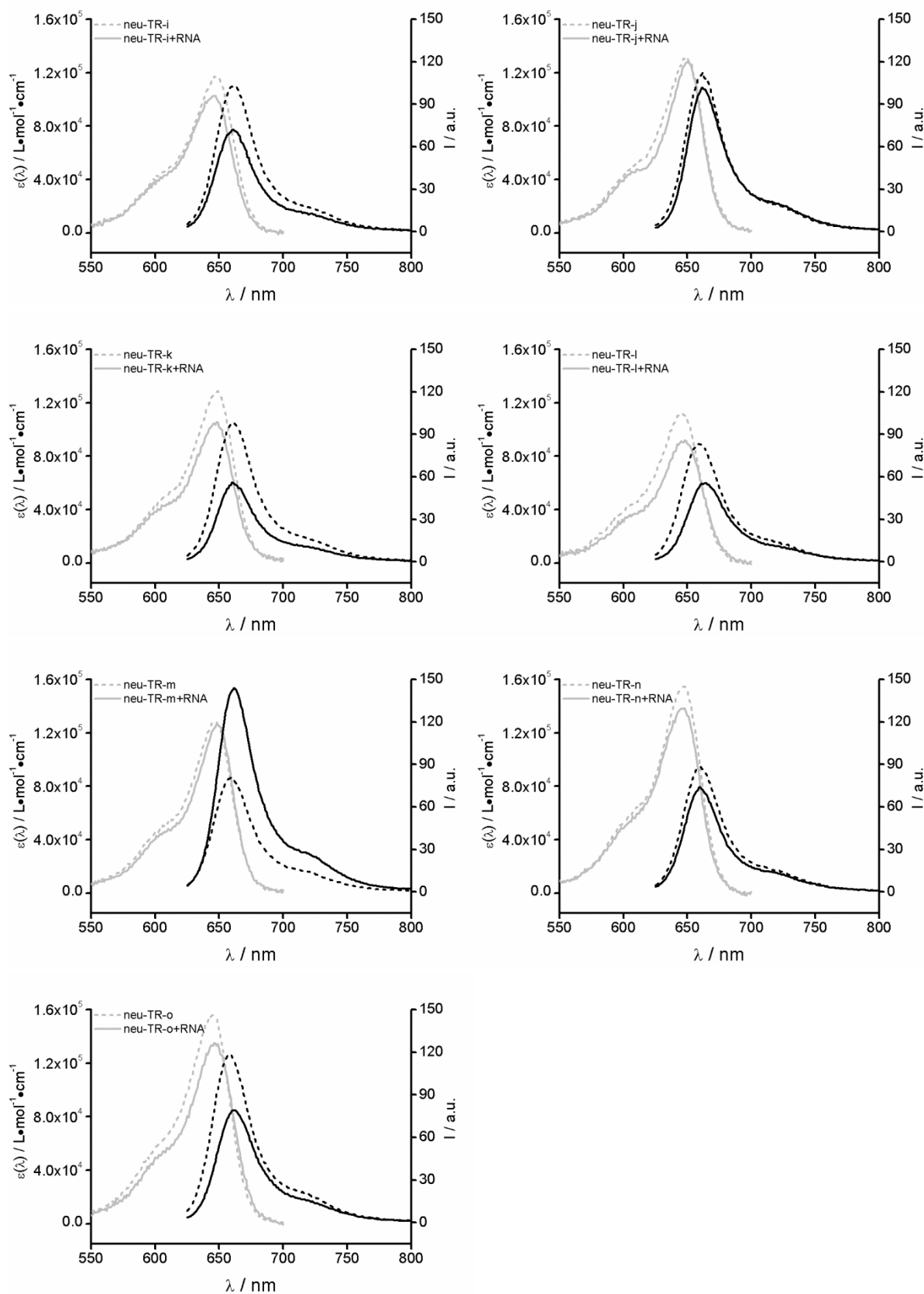
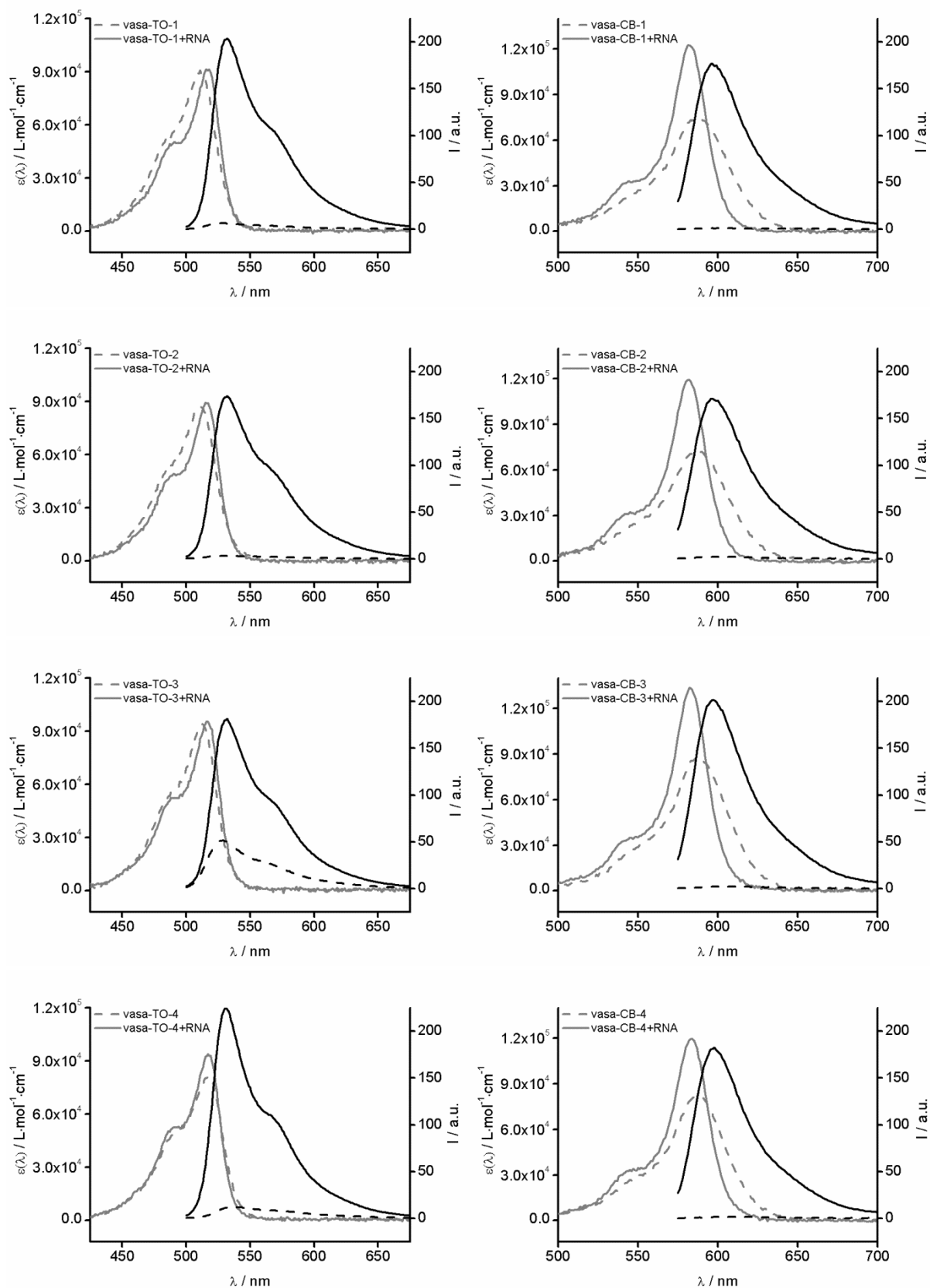


Abbildung 9.5.3: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der TR-markierten *Neuraminidase*-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 615 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 625\text{--}800 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Vergleich der Absorption und Emission von TO- und CB-markierten 1 Nt-Abstand Vasa-Sonden



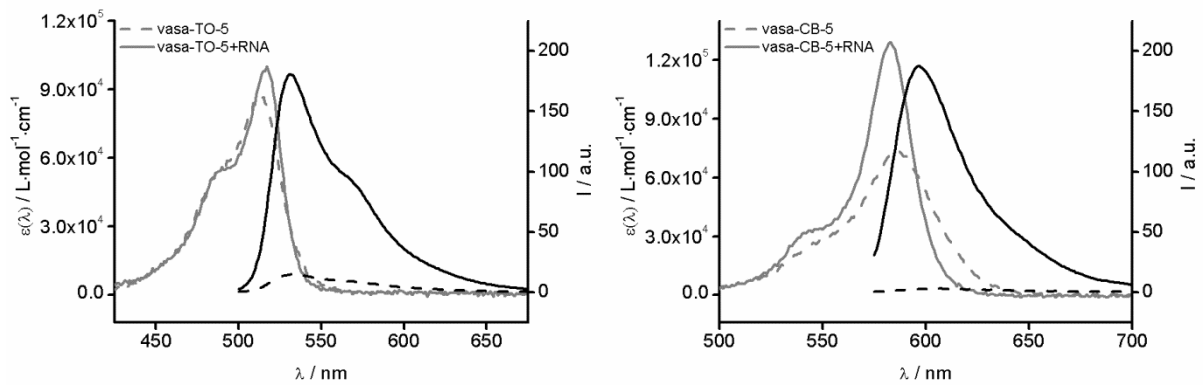


Abbildung 9.5.4: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der *Vasa*-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}675 \text{ nm}$, CB: $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 $^{\circ}\text{C}$.

Sequenzanalyse aller Ser(TO)-modifizierten DNA-FIT Sonden bei Hybridisierung mit komplementärer RNA

Tabelle 9.5.1: Sequenzanalyse der DNA FIT-Sonden.

Sequenz, X = Ser(TO)	Länge / Nt	5-Nukleotide		Ser(TO)	3'-Nukleotide		I/I ₀
		2	1		1	2	
GGACTACTTGT X GGGC	17	G	T	X	G	G	0.4
GAGTACTT X CGCTCAGGG	18	T	T	X	C	G	1.0
AGTACTTG X GCTCAGGGG	18	T	G	X	G	C	1.4
GGTTTCAGTTATT X GCCGTTGTATTT	27	T	A	X	G	C	1.4
CAGTTATT X GCCGTTG	17	T	A	X	G	C	1.4
GCGCCGTTGAT X AGTTAGC	19	A	T	X	A	G	1.4
CAGTTAT X ATGCCGTTG	17	A	T	X	A	T	1.5
GGTTTCAGTTAT X ATGCCGTTGTATTT	27	A	T	X	A	T	1.6
TCTTGATCCA X TTGTC	17	A	A	X	T	T	1.7
AGAGTACT X GCGCTCAGG	18	C	T	X	G	C	1.8
TCTTGATCC X ACTTGTC	17	C	C	X	A	C	2.1
CGGATTAAAT X ATATGC	17	A	T	X	A	T	2.2
GCGT X ACATATATAGCCG	19	T	A	X	A	C	2.2
AAAAGCGGAA X AGTTGAAGAGAA	24	G	T	X	T	G	2.4
GGA X TACTTGTGGGC	17	A	A	X	T	A	2.5
CAGTTATTAT X CCGTTG	17	A	T	X	C	C	2.5
CTCGTTTCA X TAACTGCAGT	21	C	A	X	T	A	2.7
GCGTATACATAT X AGCCG	19	T	A	X	A	G	2.9
AAAAGCGGA X AGTTTGAAGAGAA	24	A	A	X	A	G	3.1
GGTTTCAGTTATTAT X CCGTTGTATTT	27	A	T	X	C	C	3.2
GGTTTCAGTTATTATGCCGT X GTATTT	27	G	T	X	G	T	3.3
ACACAGAG X ACTTGCGCT	18	A	G	X	A	C	3.3
GGACTACTT X TTGGGC	17	T	T	X	T	T	3.6
GTA X CTGCTCAGGGGG	18	G	C	X	C	T	3.7
GGTTTCAGT X ATTATGCCGTTGTATTT	27	G	T	X	A	T	3.7
GA X CTT X AGATAATAGTTTTGGCG	24	T	T	X	A	G	3.8
GCGCCGT X GATTAGTTAGC	19	G	T	X	G	A	3.9
CGGATT X AATAATATGC	17	T	T	X	A	A	4.0
ACTTGCGC X CAGGGGGTG	18	G	C	X	C	A	4.0
CGGTTTT X TGGCTTTGGGT	19	T	T	X	T	G	4.1
CAGTTATT X TGCCGTTG	17	T	T	X	T	G	4.4
ACCGATTTTGTTC X GAAC	19	C	C	X	G	A	4.5

GTCXGTTTTCGATATTCAC	19	T	C	X	G	T	4.5
GCGCCGTTXATTAGTTAGC	19	T	T	X	A	T	4.6
GCGTATACAXATATAGCCG	19	C	A	X	A	T	4.6
CGGTTTTCTGGCTXTGGGT	19	C	T	X	T	G	4.6
GGTTTCAGTTATTATGXCGTTGTATTT	27	T	G	X	C	G	4.8
TACTTGCGXTCAGGGGGT	18	C	G	X	T	C	4.9
GGTTTCAGTTAXTATGCCGTTGTATTT	27	T	A	X	T	A	5.0
GCGCCGTTGAXTAGTTAGC	19	G	A	X	T	A	5.0
CACAGAGTXCTTGCCTC	18	G	T	X	C	T	5.1
GCGCCGTTGATTXGTTAGC	19	T	T	X	G	T	5.2
CAGTTATTATGXCGTTG	17	T	G	X	C	G	5.2
GGCCGCCXTTTTTCTG	17	C	C	X	T	T	5.2
GACTTAAGATAATAGGTTXTGGCG	24	T	T	X	T	G	5.4
CTCGTTTCAATAAXTTGCAGT	21	A	A	X	T	T	5.6
GGTTTCAXTTATTATGCCGTTGTATTT	27	C	A	X	T	T	5.6
GACTTAAGATAATAGGTTXTGGCG	24	G	T	X	T	T	5.9
CAGTTATTATGCXGTTG	17	G	C	X	G	T	6.0
TCTTGATCCAACXTGTC	17	A	C	X	T	G	6.1
GGTTTCAGTTATTXTGCCGTTGTATTT	27	T	T	X	T	G	6.2
AAAAGCXGAAAAGTTTGAAGAGAA	24	G	C	X	G	A	6.4
TCTATXTTCATCATTTTCA	19	A	T	X	T	T	6.5
GGTTTCAGTTATTATGCXGTTGTATTT	27	G	C	X	G	T	6.6
GGTTTCXGTTATTATGCCGTTGTATTT	27	T	C	X	G	T	6.7
GGCCGCCGXTTTTCTG	17	C	G	X	T	T	6.8
CAGCCGXTTTTCTGTG	15	C	G	X	T	T	6.9
TCCATXTTCATTATTTTCT	19	A	T	X	T	T	6.9
TCTATTTTCATCATXTTCA	19	A	T	X	T	T	7.2
GCGCCGTTGATTAXTTAGC	19	T	A	X	T	T	7.4
GCGCCXTTGATTAGTTAGC	19	C	C	X	T	T	7.8
CAGTTAXTATGCCGTTG	17	T	A	X	T	A	7.9
GGCCXCCGTTTTTCTG	17	C	C	X	C	C	8.0
GGAAC TACXTGTTGGGC	17	A	C	X	T	G	8.1
ACCGATTTTXTTCCAGAAC	19	T	T	X	T	T	8.2
CTCGTTTCAATAACXTGCAGT	21	A	C	X	T	G	8.5
CAGAGTACXTGCGCTCAG	18	A	C	X	T	G	8.6
TCTTGXTCCAAC TTGTC	17	T	G	X	T	C	8.7
GGCCGCCGTTXTTCTG	17	T	T	X	T	T	8.7
GCGCCGTTGXTTAGTTAGC	19	T	G	X	T	T	8.8
ACAGAGTAXTTGCGCTCA	18	T	A	X	T	T	8.9
CTCGXTTCAATAACTTGCAGT	21	C	G	X	T	T	9.1
ACCGXTTTTGTTCAGAAC	19	C	G	X	T	T	9.1
CGGTXTTCTGGCTTTGGGT	19	G	T	X	T	T	9.4
GCGCCGX TGATTAGTTAGC	19	C	G	X	T	G	9.5
CGGTTTTCTGGXTTTGGGT	19	G	G	X	T	T	9.5
GGTTTCAGTTATTATGCCXTTGTATTT	27	C	C	X	T	T	9.7
GTCAGTTTTCGXTATTCAC	19	C	G	X	T	A	9.9
GGTTTCAGTTXTTATGCCGTTGTATTT	27	T	T	X	T	T	10.6
ACCGATXTTGTTCAGAAC	19	A	T	X	T	T	10.9
CAGTTXTTATGCCGTTG	17	T	T	X	T	T	11.5
TCTATTXTCATCATTTTCA	19	T	T	X	T	C	11.5
GGTTTCAGTTATTATGCCGX TGATTT	27	C	G	X	T	G	12.0
GGTTTCAGXTATTATGCCGTTGTATTT	27	A	G	X	T	A	12.2
GCGCCGTTGATTAGXTAGC	19	A	G	X	T	A	12.4
GACTTAAGATAXTAGGTTTTGGCG	24	T	A	X	T	A	12.5
GTCAGTXTTCGATATTCAC	19	G	T	X	T	T	13.3

9. Anhang

TCTATTTTC X TCATTTTCA	19	T	C	X	T	C	13.9
GTCAG X TTTCGATATTCAC	19	A	G	X	T	T	14.6
AAAAGCGGAAAAG X TTGAAGAGAA	24	A	G	X	T	T	16.2
TCCATTTTCATTAT X TTCT	19	A	T	X	T	T	17.6
CGGATTA X TAATATGC	17	A	A	X	T	A	20.8
TCCATTTTCATT X TTTTCT	19	T	T	X	T	T	22.7
TCCATTTTC X TTATTTTCT	19	T	C	X	T	T	27.9

Bedingungen: 1 Äq. Sonde und 5 Äq. vollständig komplementäre Ziel-RNA bei Zugabe, in PBS; $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 535 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

9.6 Anhang zu Kapitel 4.7

Orientierende Untersuchung zur Detektion von A-zu-I-Editierung

komplementäre RNA (*match*): CACGAAAAACGGCUG

A-zu-I RNA (*mismatch*): CACGAAAdIACGGCUG, mit dI = Desoxy-Inosin

Tabelle 9.6.1: Sonden und Fluoreszenzdaten zur Detektion von A-zu-I-Editierung.

A-zu-I-	Sequenz ^a , X = Ser(TO)	T _M ^b / °C		I ₀	<i>match</i>		<i>mismatch</i>		D ^c
		<i>m</i>	<i>mm</i>		I _m	I/I ₀	I _{mm}	I/I ₀	
DNA-1	CAGCCGXTTTTCGTG	42.5	30.0	18	121	6.9	39	2.2	4.8
LNA-1	CAGCCGXT _L TTTCGTG	50.5	40.0	28	197	7.0	131	4.7	1.6
LNA-2	CAGCCGTT _L XTTCGTG	49.7	40.5	15	83	5.4	40	2.6	2.7

[a] tiefgestelltes „L“ = LNA-Nukleotid, [b] m = komplementäre RNA (*match*), mm = A-zu-I-RNA (*mismatch*), [c] D = Diskriminierung = (I_m-I₀)/(I_{mm}-I₀).

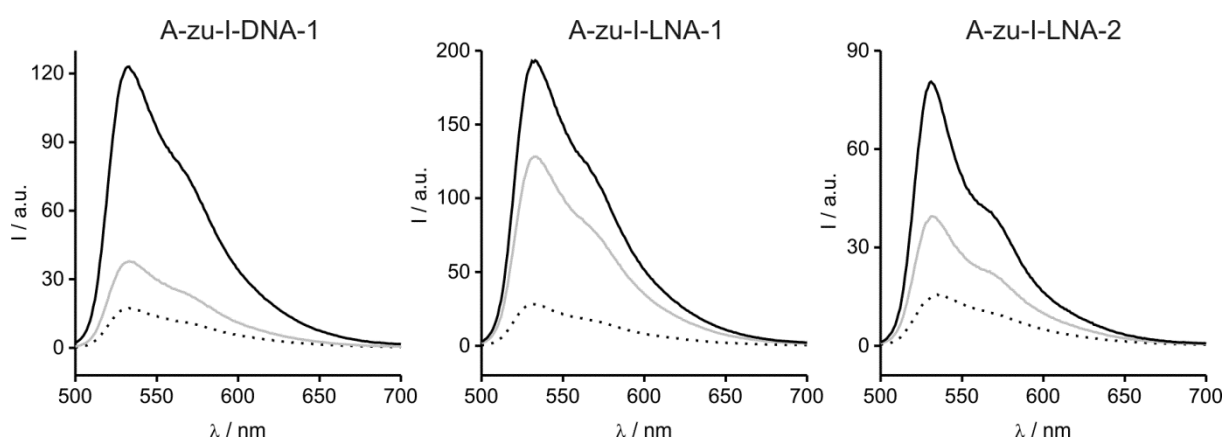


Abbildung 9.6.1: Fluoreszenzemission der Sonden zur Detektion von A-zu-I-Editierung im Einzelstrang (gestrichelt) und in Anwesenheit von komplementärer RNA (*match*, schwarze Linien) bzw. A-zu-I-RNA (*mismatch*, graue Linien). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7), in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); λ(ex) = 485 nm, λ(em) = 500-700 nm, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

9.7 Anhang zu Kapitel 4.8

F-Tag(TO)-11mer DNA- und LNA-Sonden

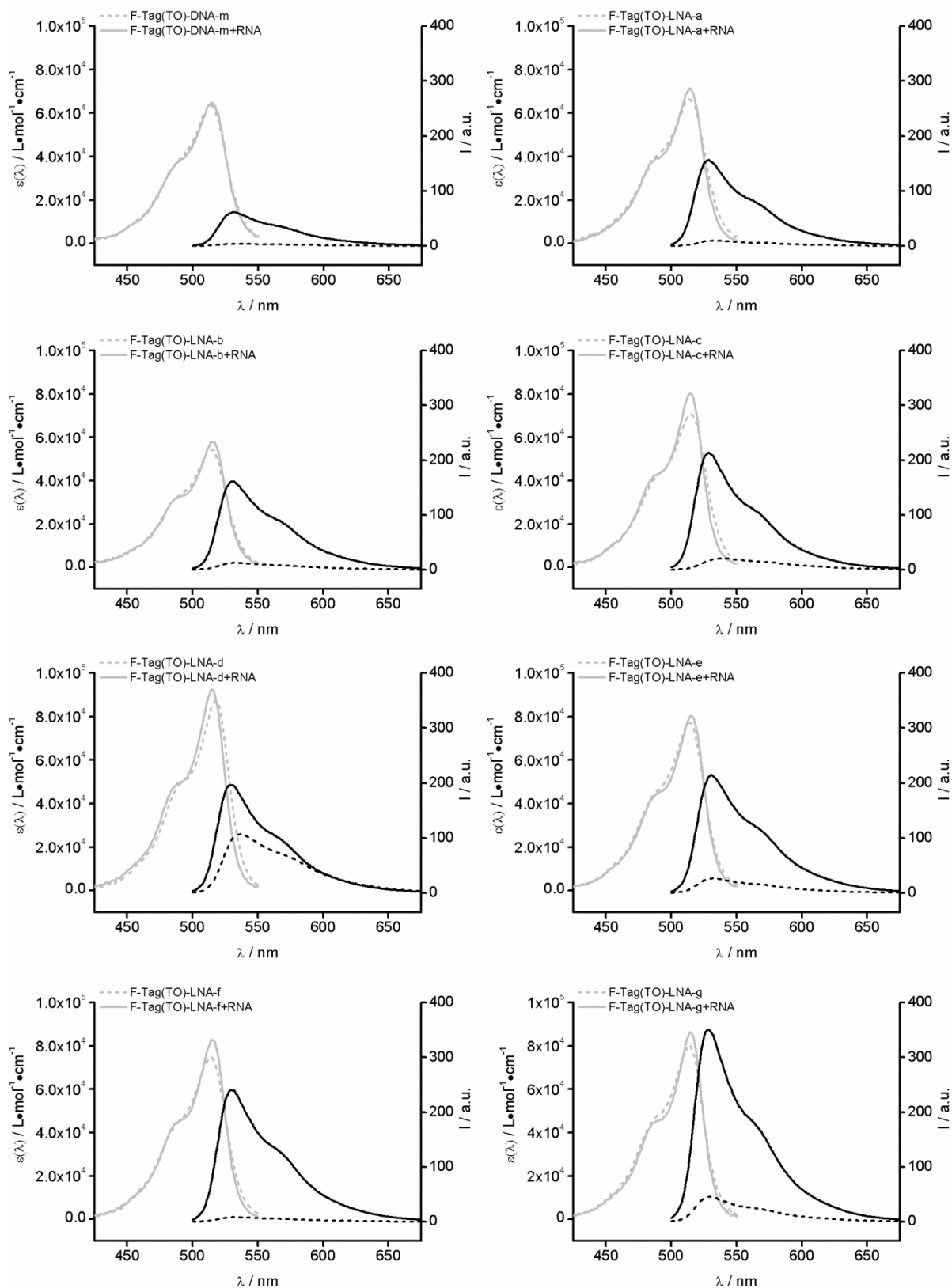


Abbildung 9.7.1: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) ausgewählter F-Tag(TO)-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μ M Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}675 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 $^{\circ}\text{C}$.

F-Tag(BO)-11mer DNA- und LNA-Sonden

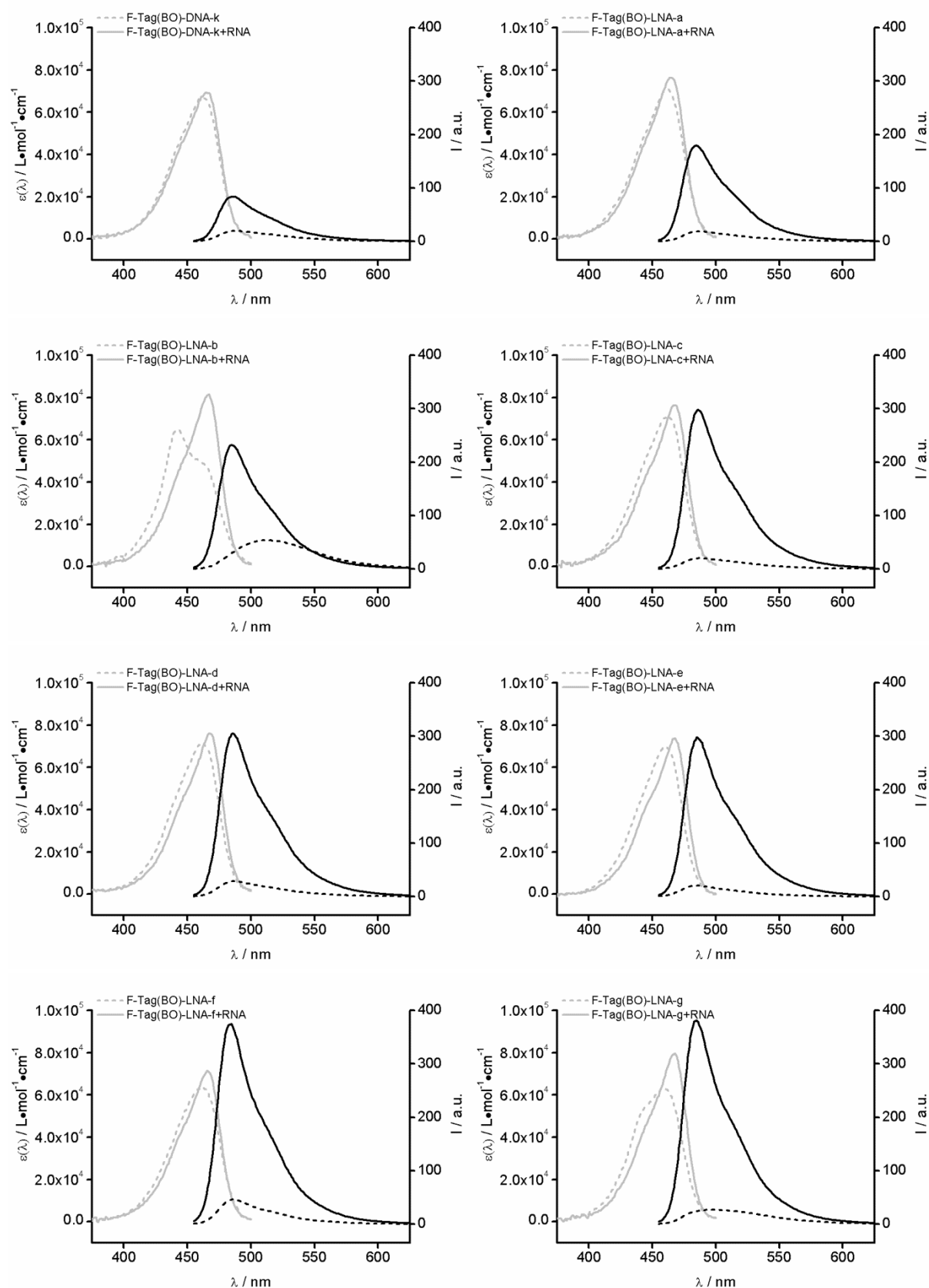
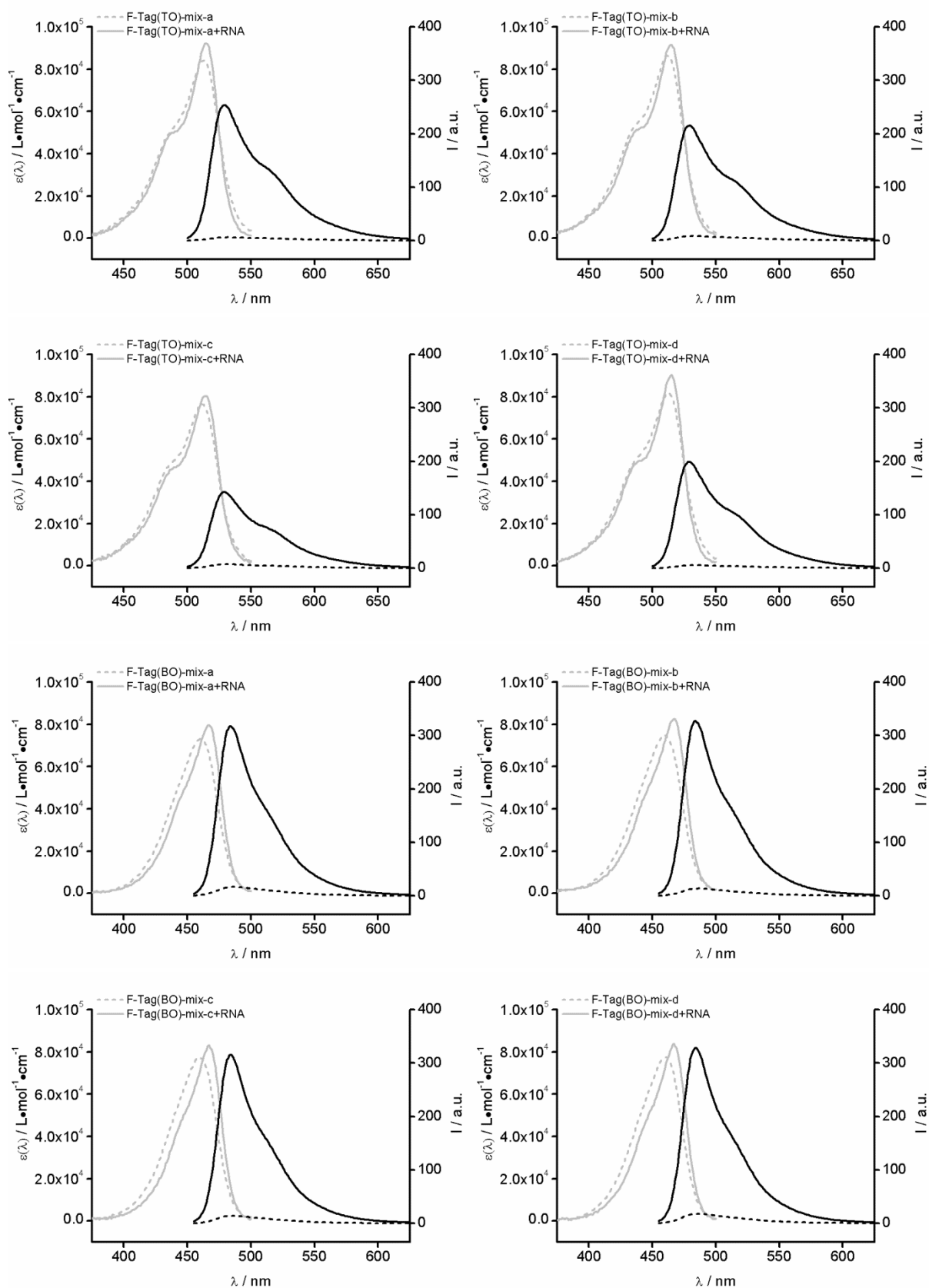


Abbildung 9.7.2: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) ausgewählter F-Tag(TO)-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 Äq. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 455\text{--}655 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

F-Tag(TO)-, F-Tag(BO)- und F-Tag(CB)-LNA/2'-O-Me-Sonden



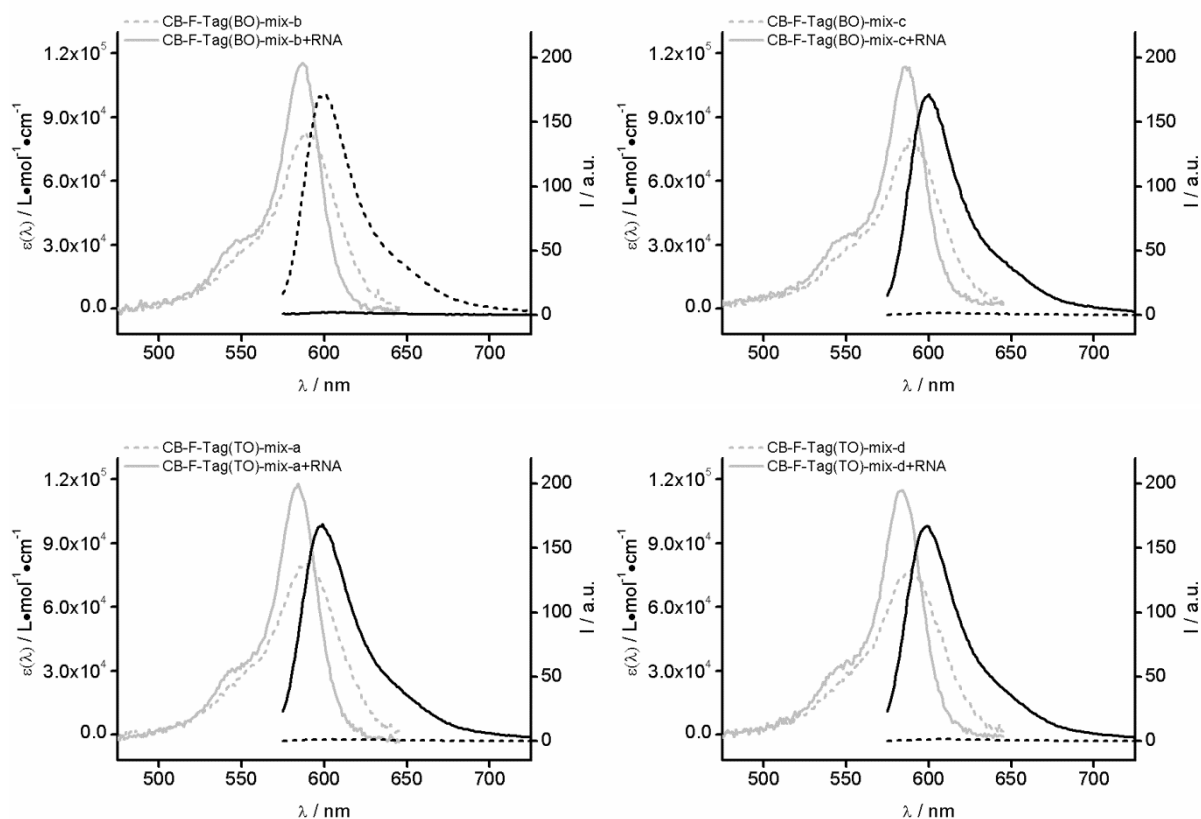


Abbildung 9.7.3: Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) ausgewählter F-Tag-mix-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit von komplementärer RNA (durchgehend). Bedingungen: 0.5 μM Sonde und 5 \AA q. Ziel-RNA, bei Zugabe, in PBS, in 1 mL-Küvette (Schichtdicke = 1 cm); TO: $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 500\text{-}675 \text{ nm}$, CB: $\lambda(\text{ex}) = 560 \text{ nm}$, $\lambda(\text{em}) = 575\text{-}700 \text{ nm}$, slit(ex) = 5 nm, slit(em) = 5 nm, 37 °C.

Untersuchung zur Resistenz ausgewählter F-Tag(BO)- und F-Tag(TO)-Sonden gegenüber DNase-I-Verdau

Zur Überprüfung der Resistenz der entsprechenden Sonden wurden die DNA- bzw. LNA-basierten Vorläufersonden sowie die beiden vielversprechendsten LNA/OMe-Sonden für jeweils BO und TO mit Ziel-RNA-hybridisiert (RNA(TO)-1 bzw. RNA(BO)-1) und DNase-I versetzt und die Fluoreszenzemission der Chromophore aufgezeichnet. Die Experimente wurden analog zur Beschreibung in Kapitel 6.5 durchgeführt. Sowohl für BO- als auch für TO-markierte LNA/OMe-Sonden bestätigte sich die große Stabilität gegenüber Nukleaseverdau.

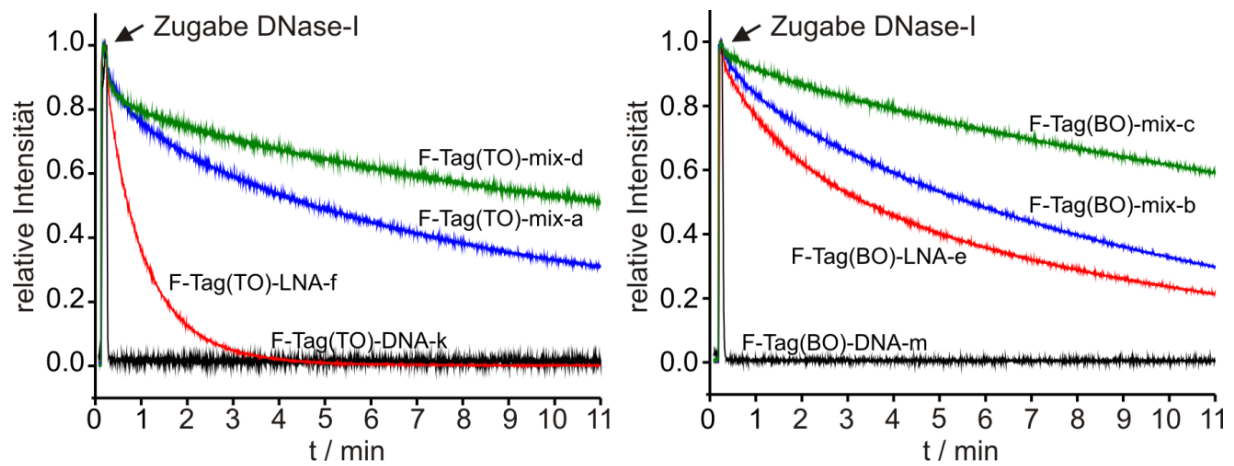
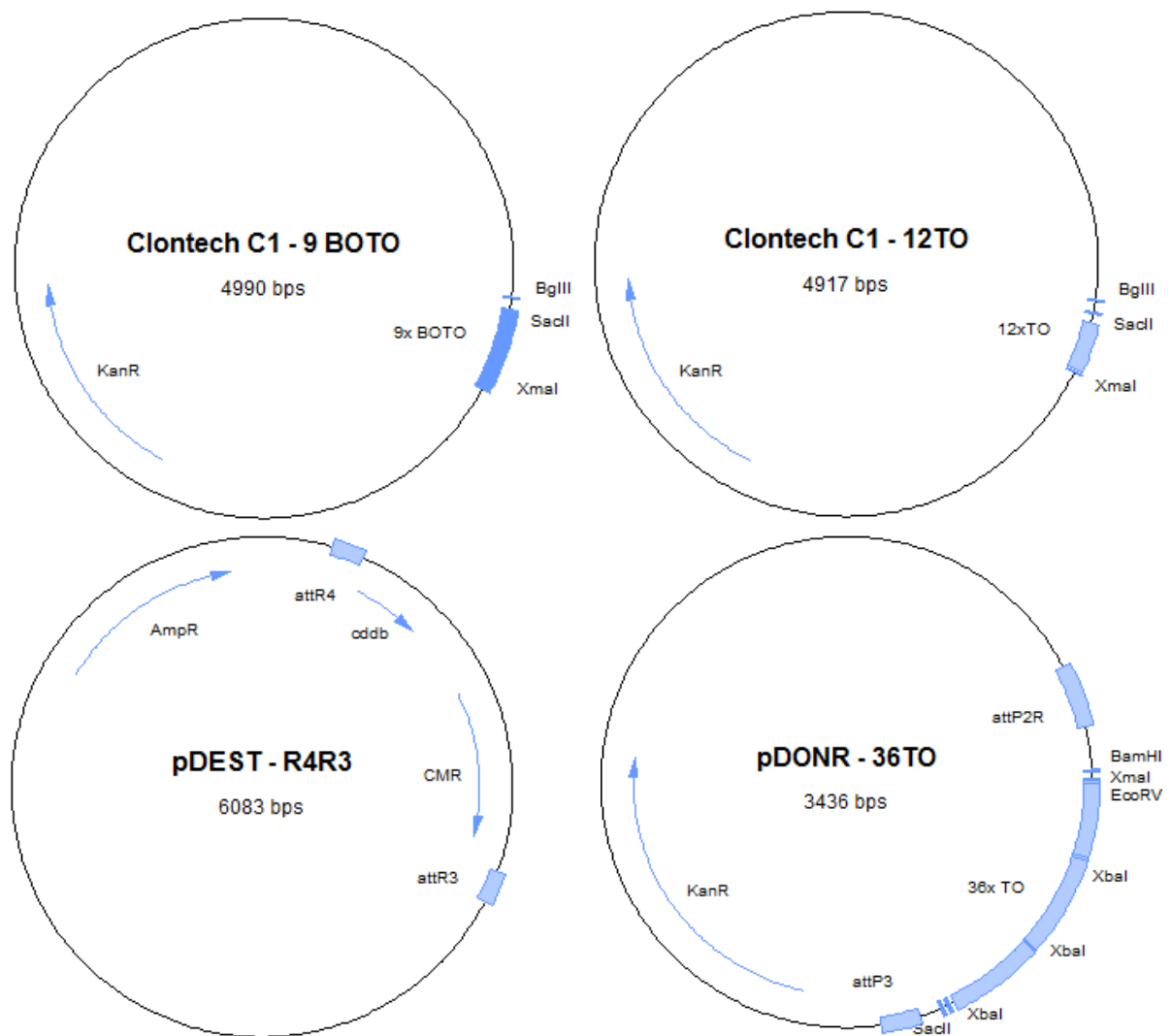
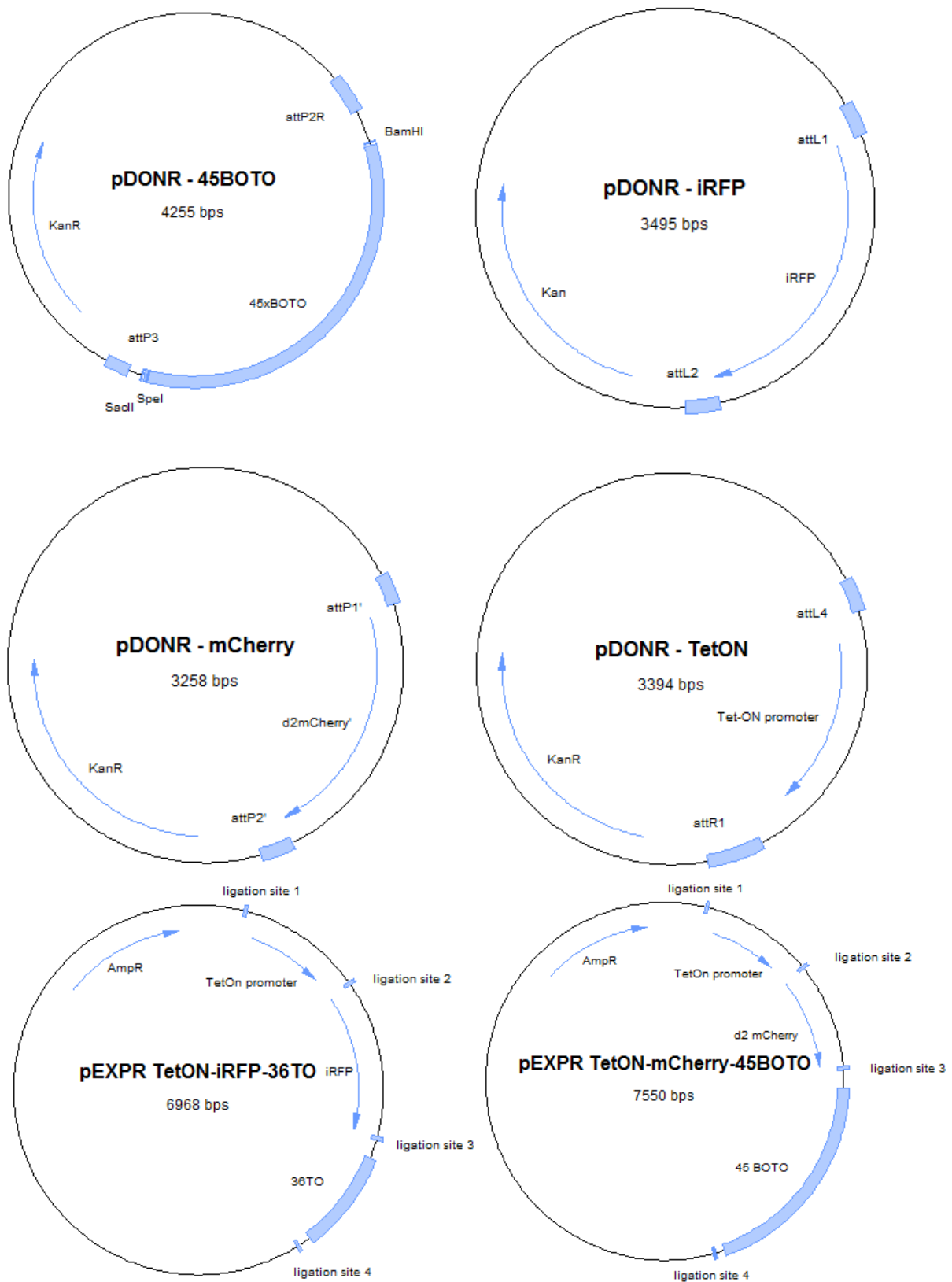


Abbildung 9.7.4: Verdau von Sonden-Ziel-RNA-Komplexen mittels DNase-I; F-Tag(TO)-Sonden (links), F-Tag(BO)-Sonden (rechts). Experimentelle Details siehe Kapitel 6.5.

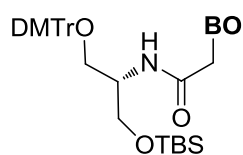
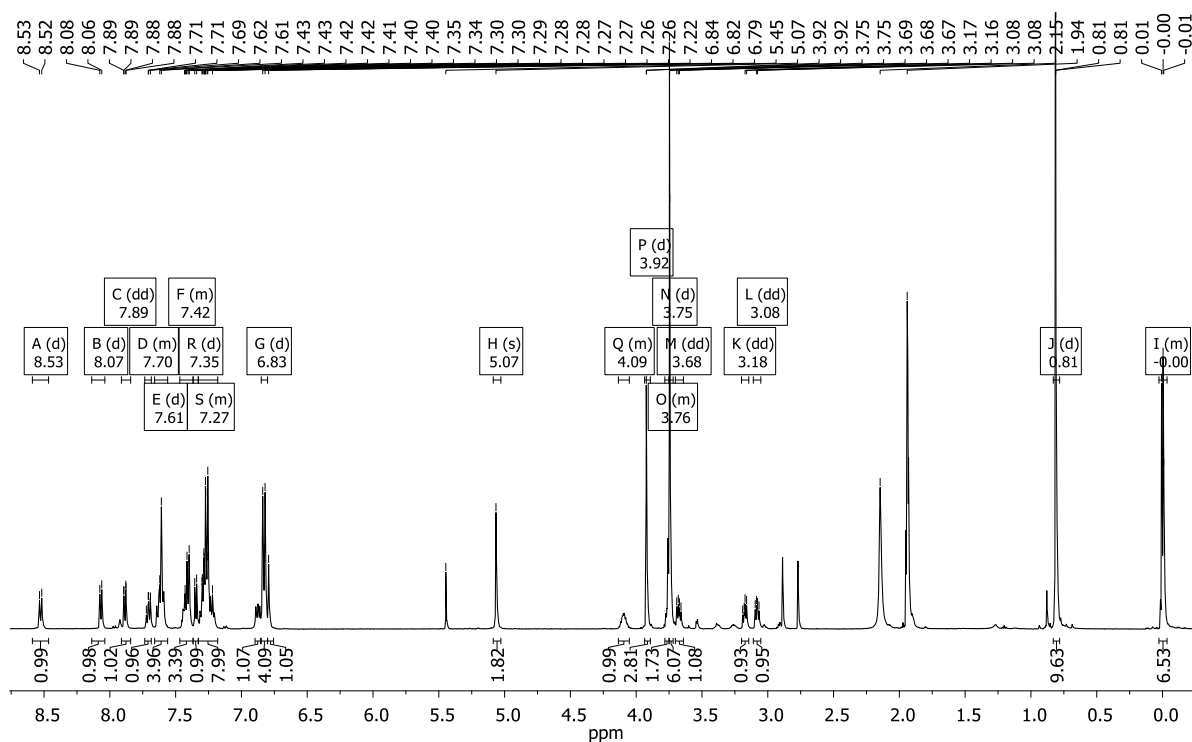
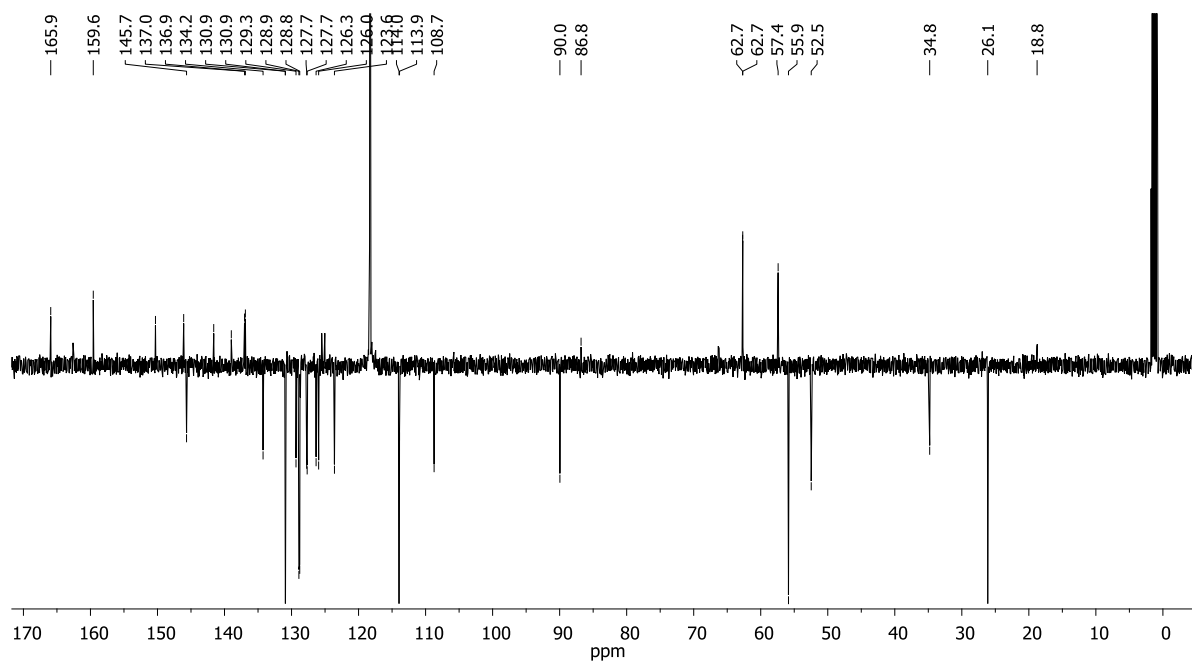
Plasmidkarten



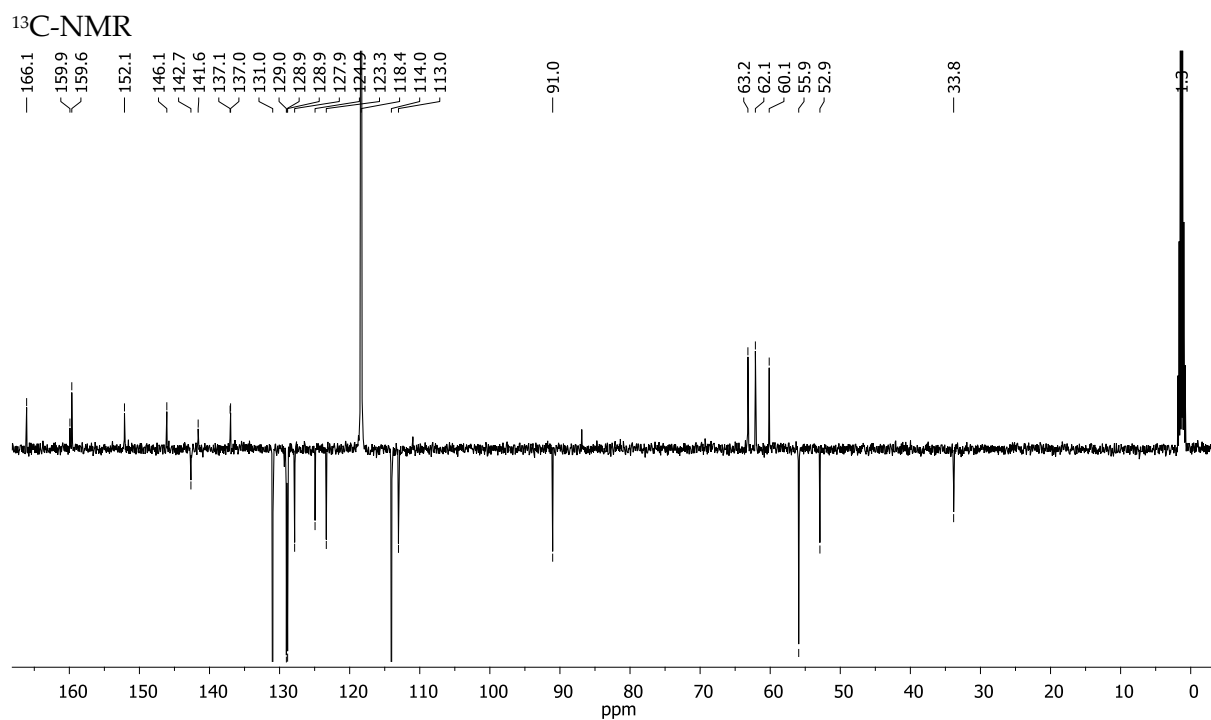
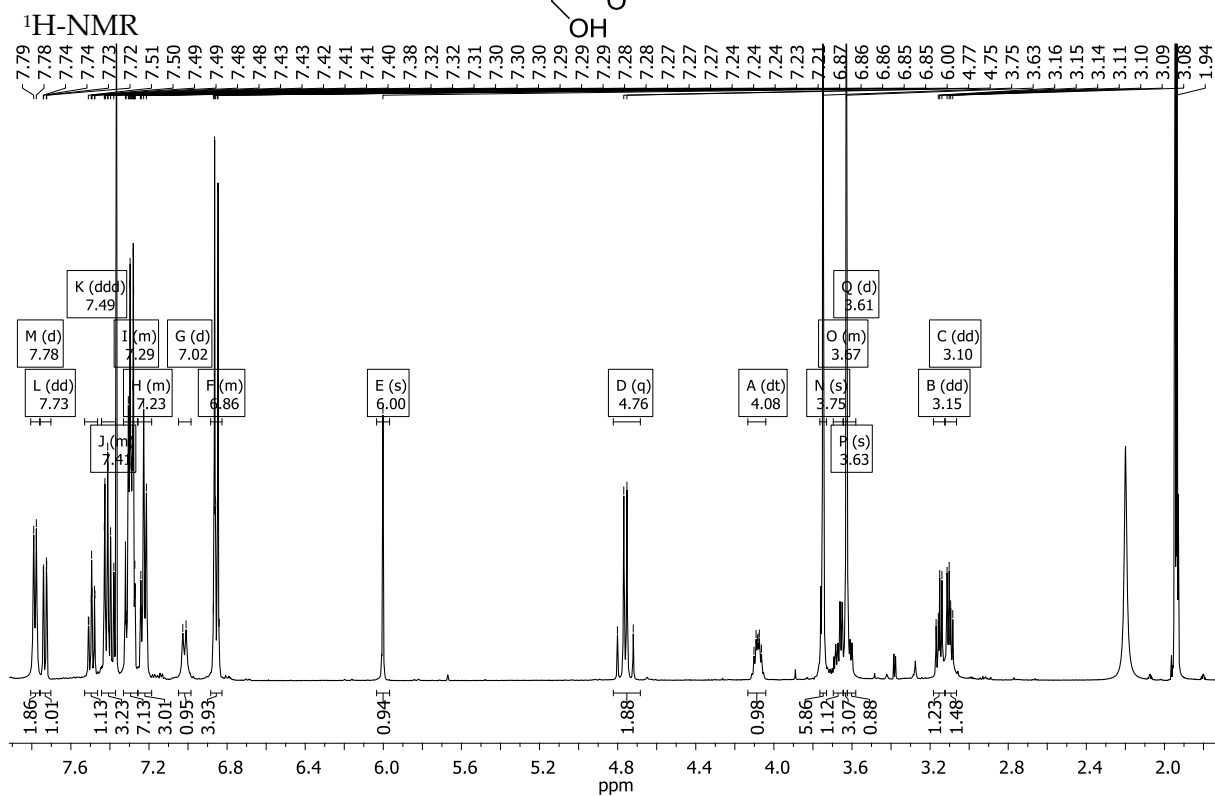
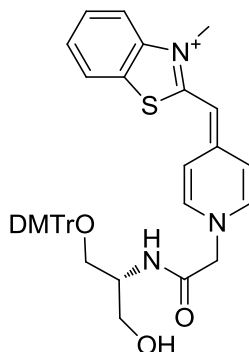


9.8 NMR-Spektren

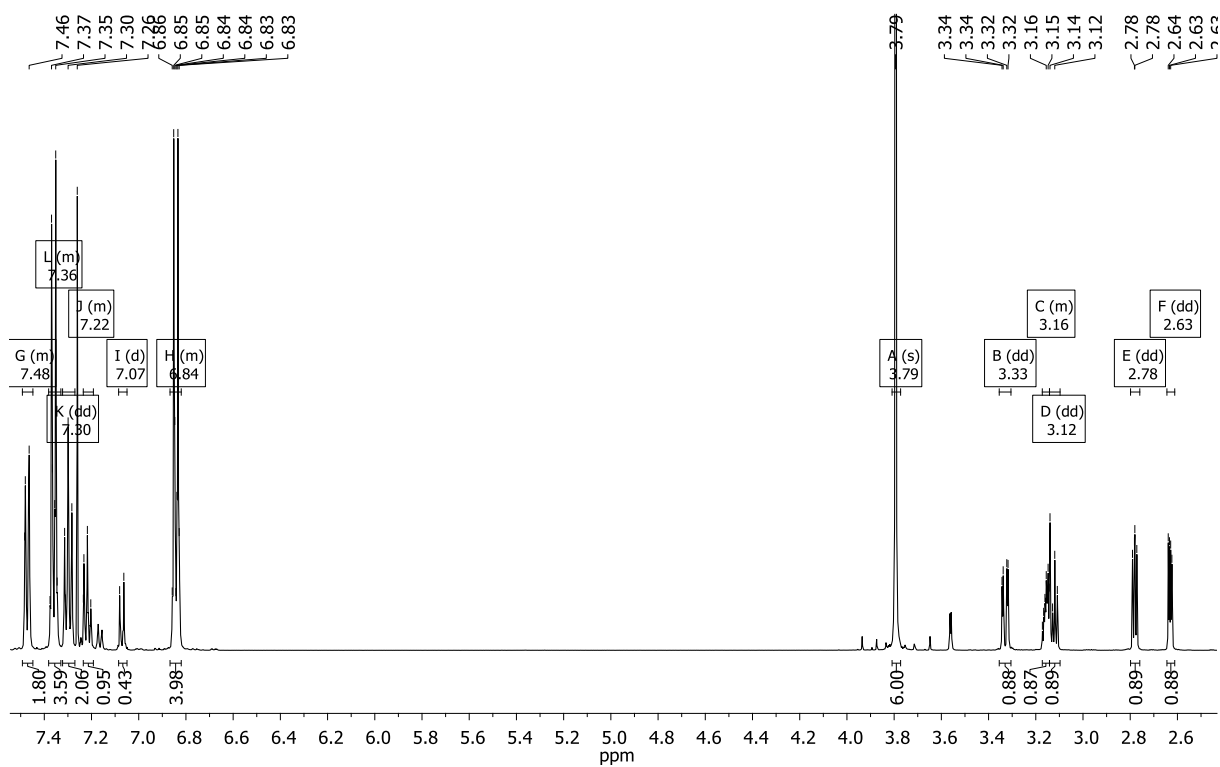
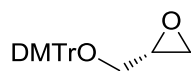
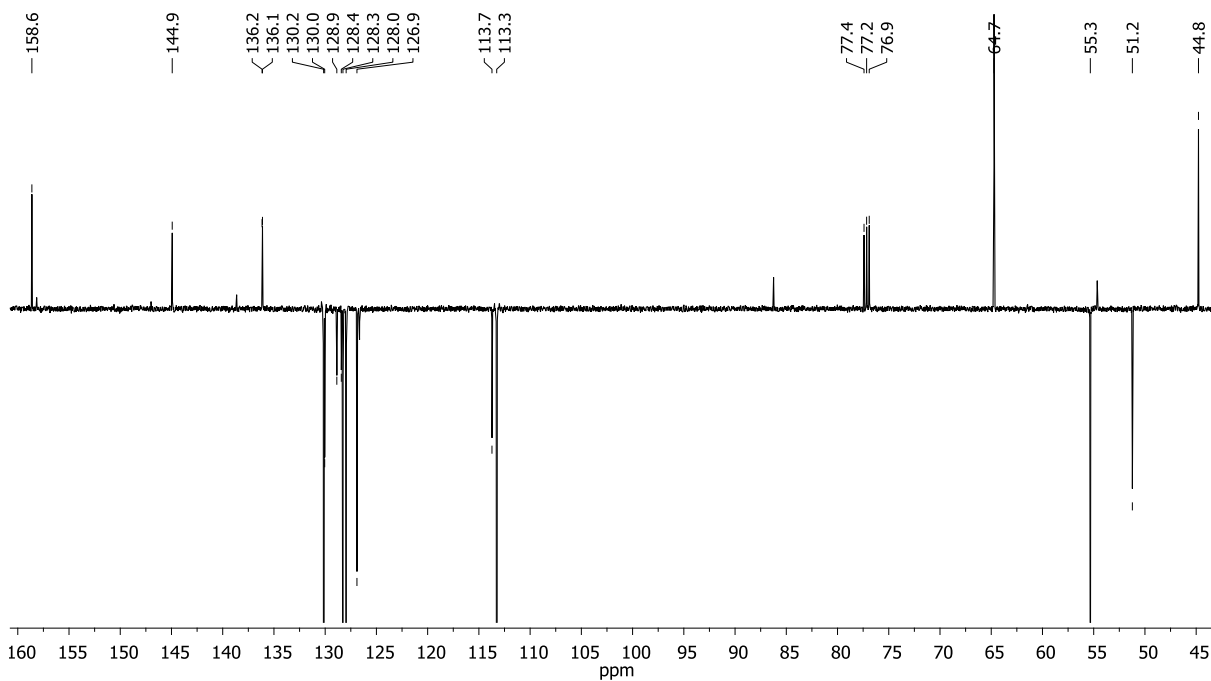
Ser(BO)-DMTr-TBS (15)

 ^1H -NMR ^{13}C -NMR

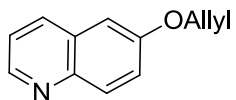
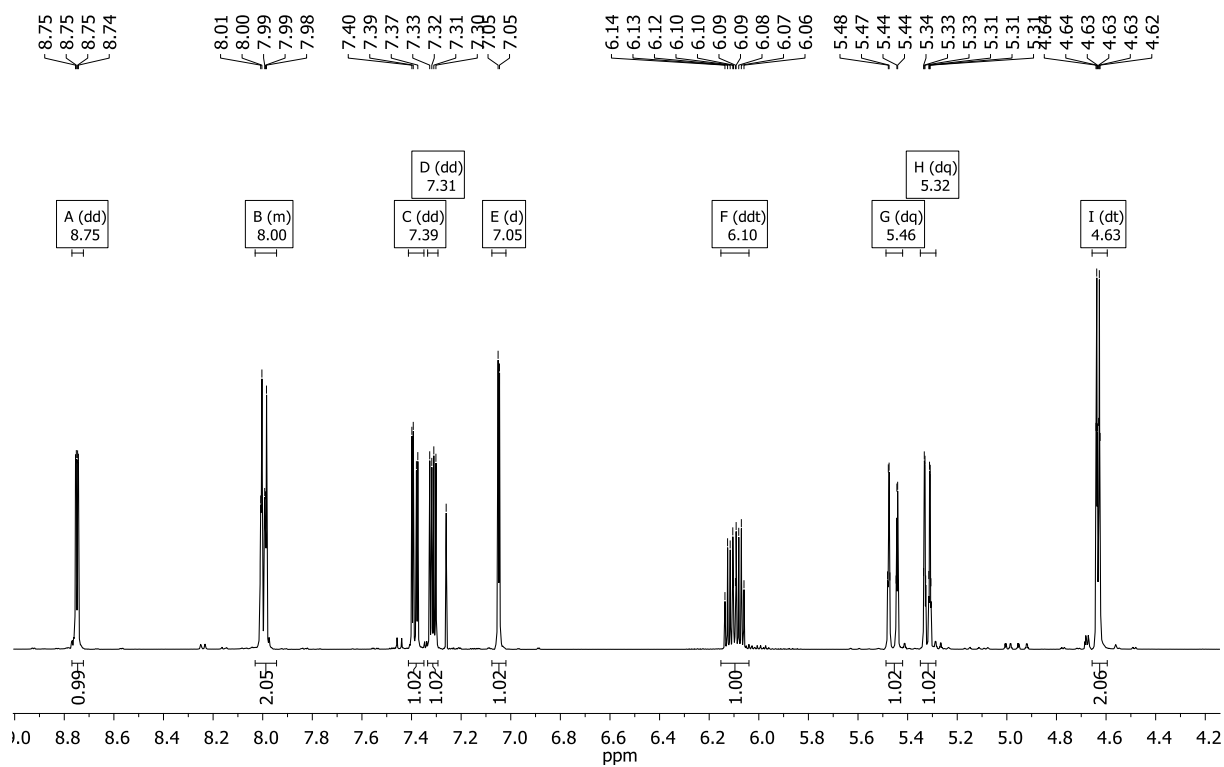
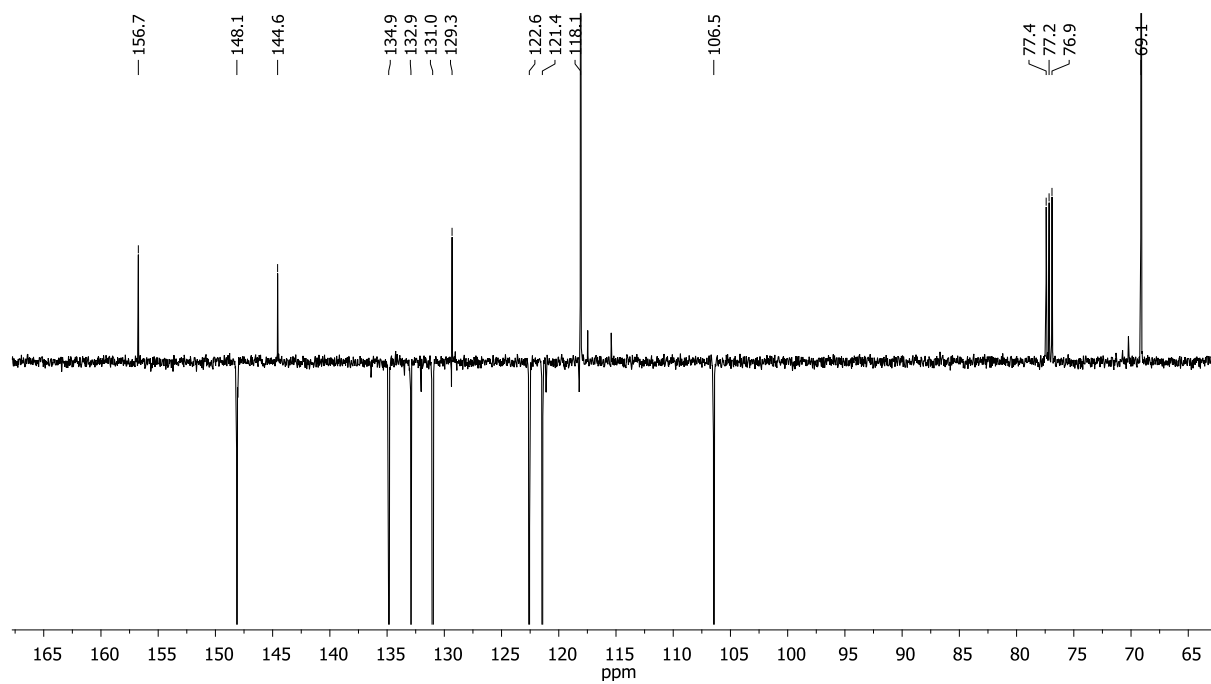
Ser(BO)-DMTr-OH (17)



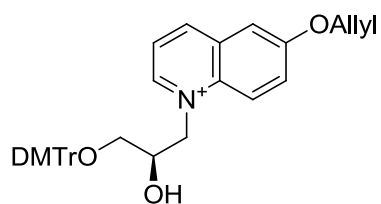
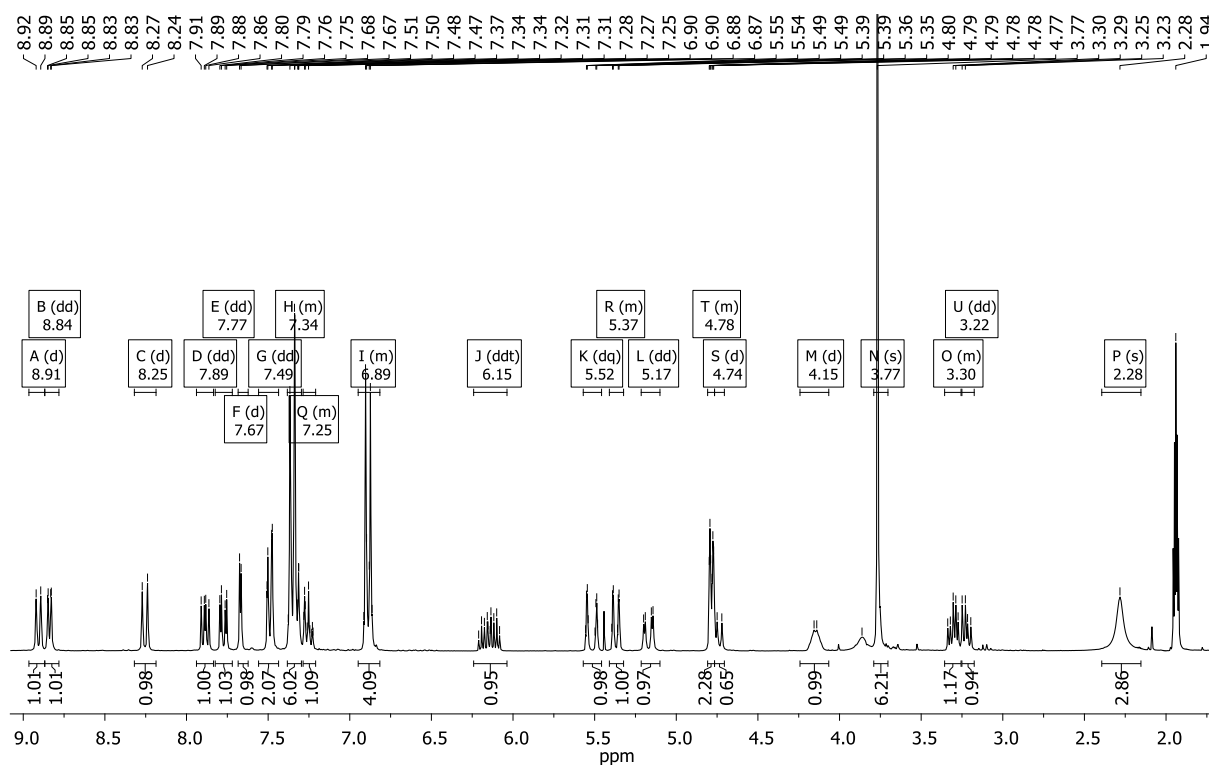
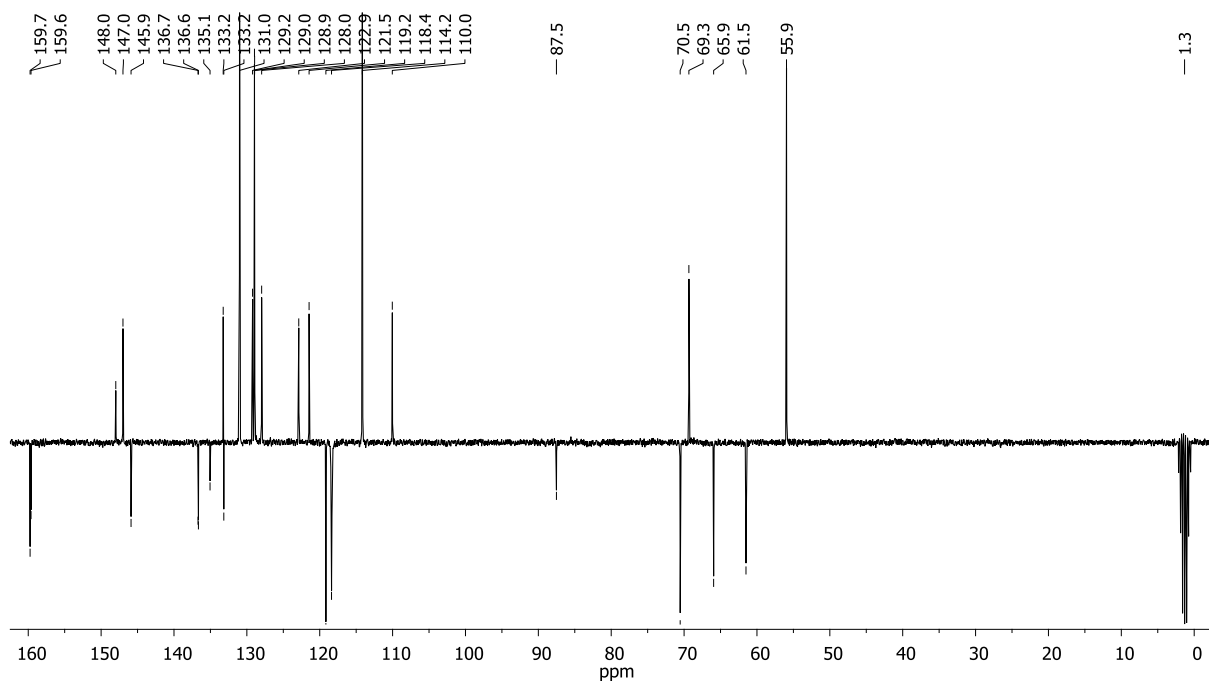
DMTr-Oxiran (34)

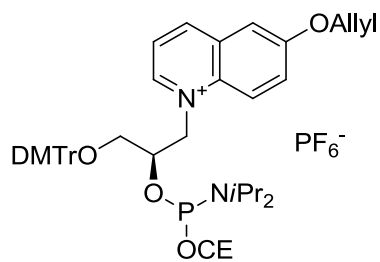
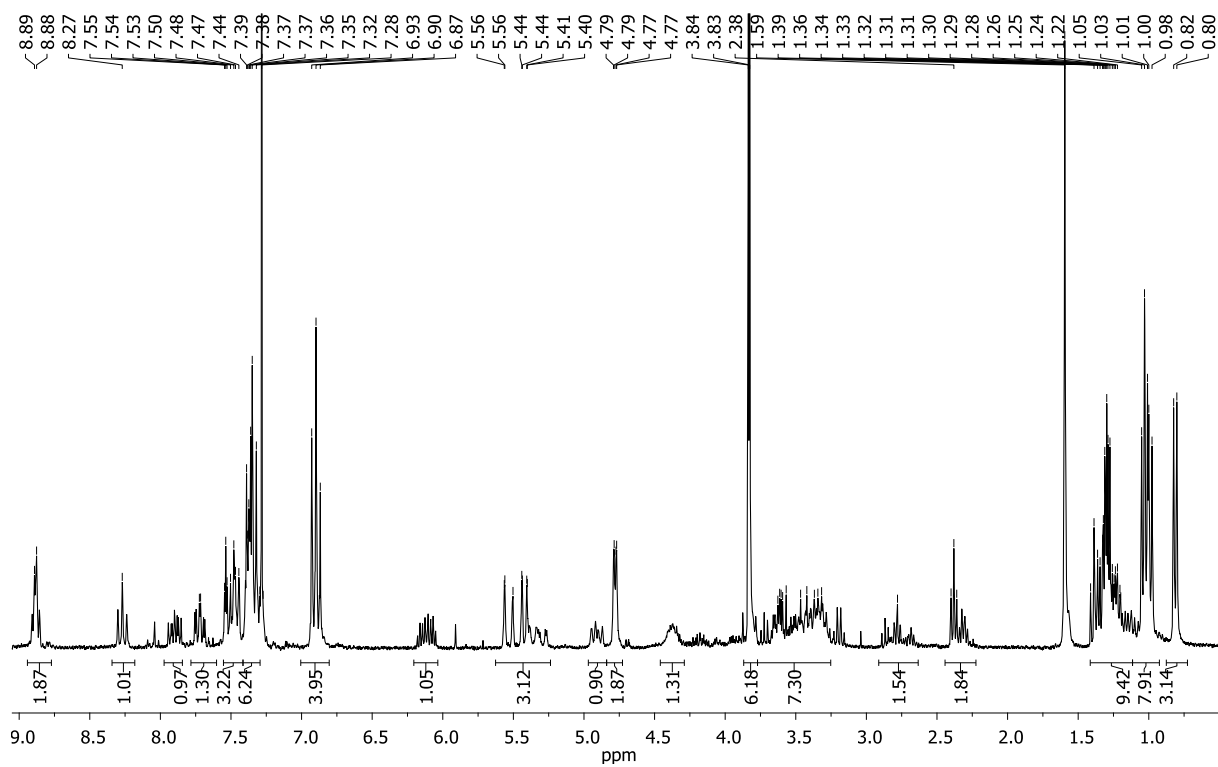
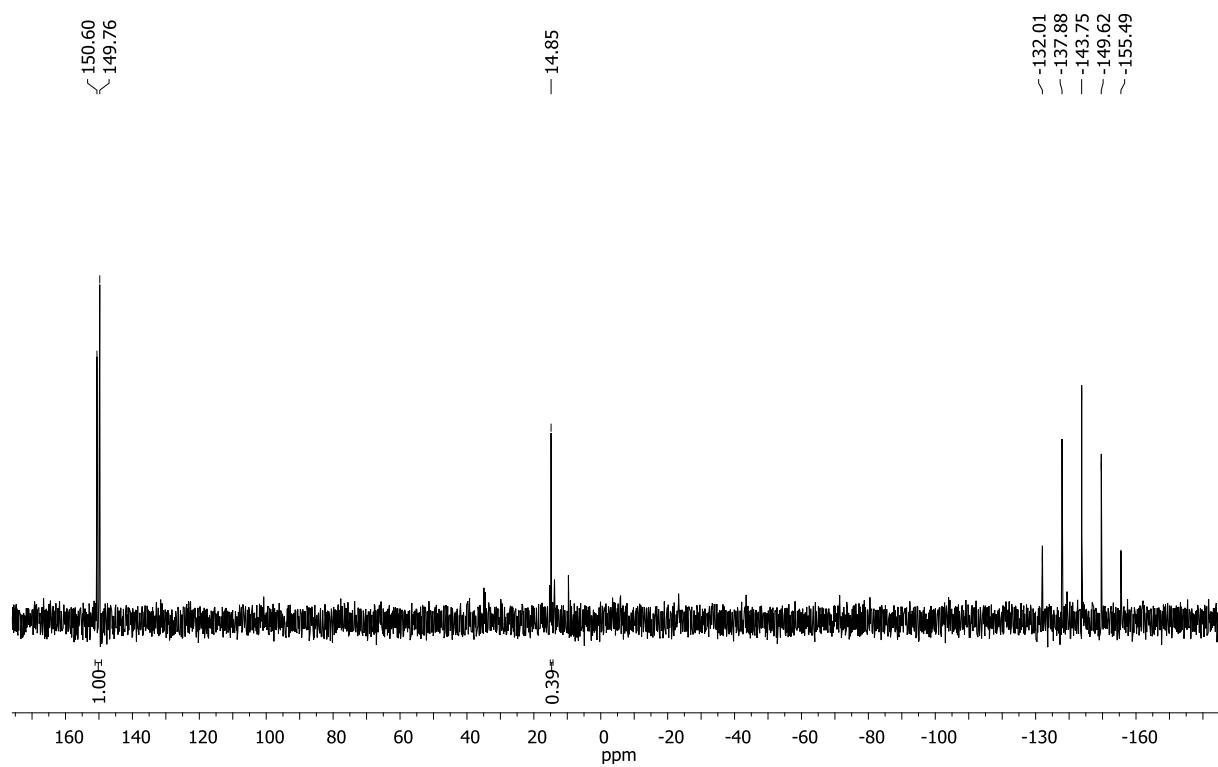
 ^1H -NMR ^{13}C -NMR

Allyl-Oxychinolin (32)

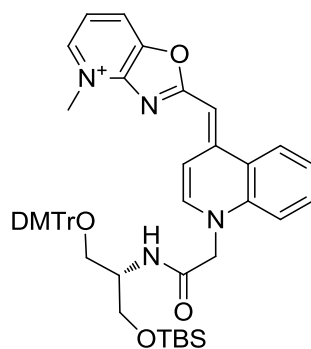
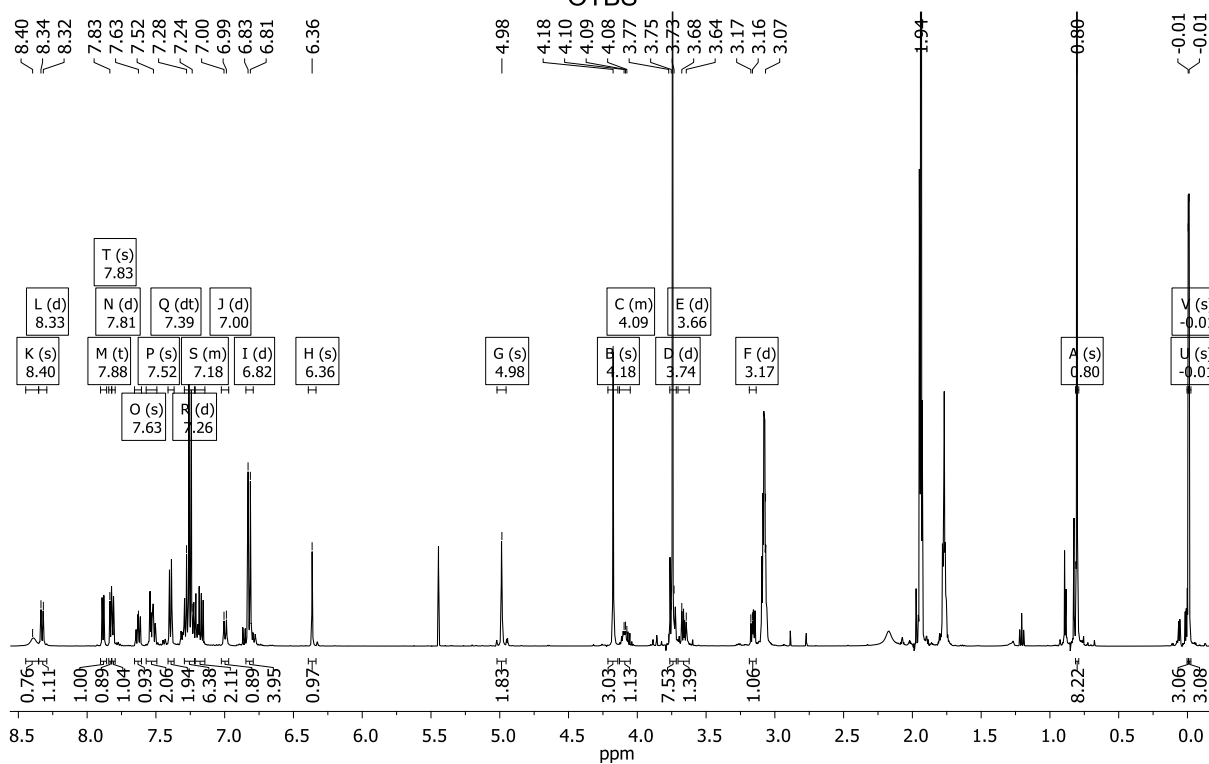
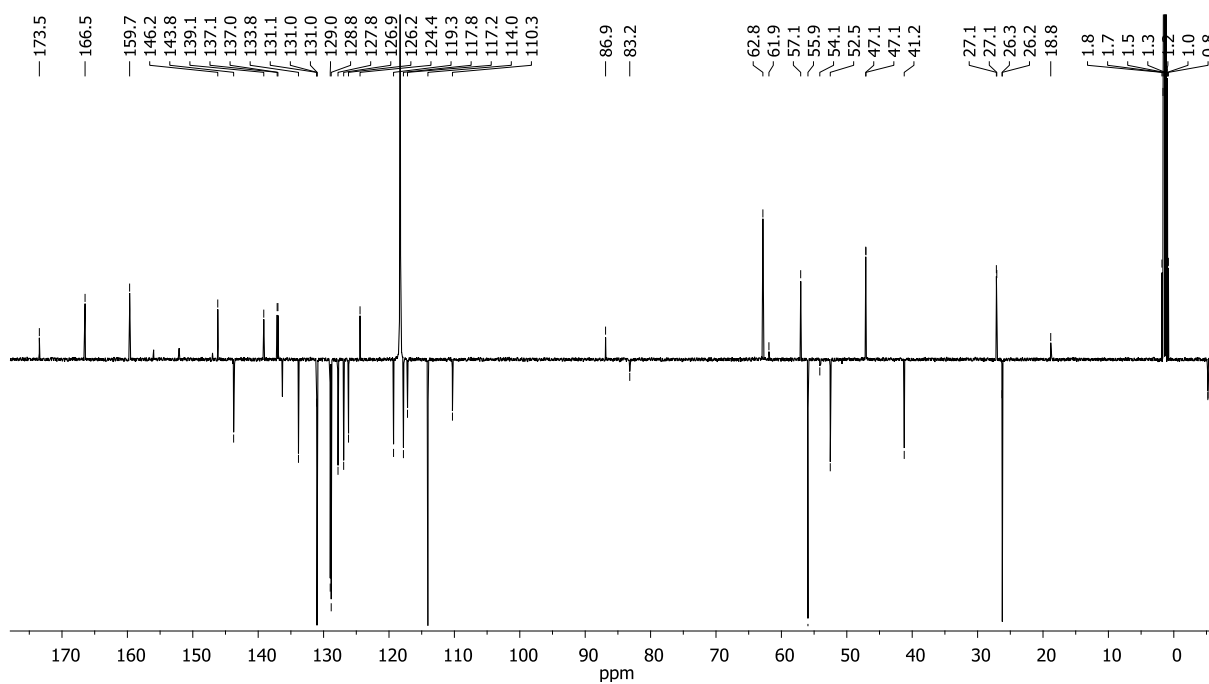
¹H-NMR¹³C-NMR

Glycerol-6HQ-DMTr (35)

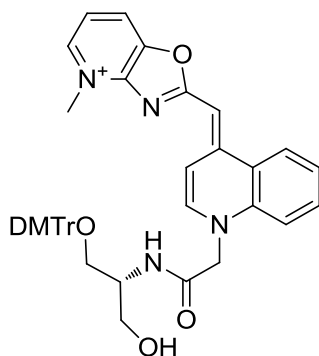
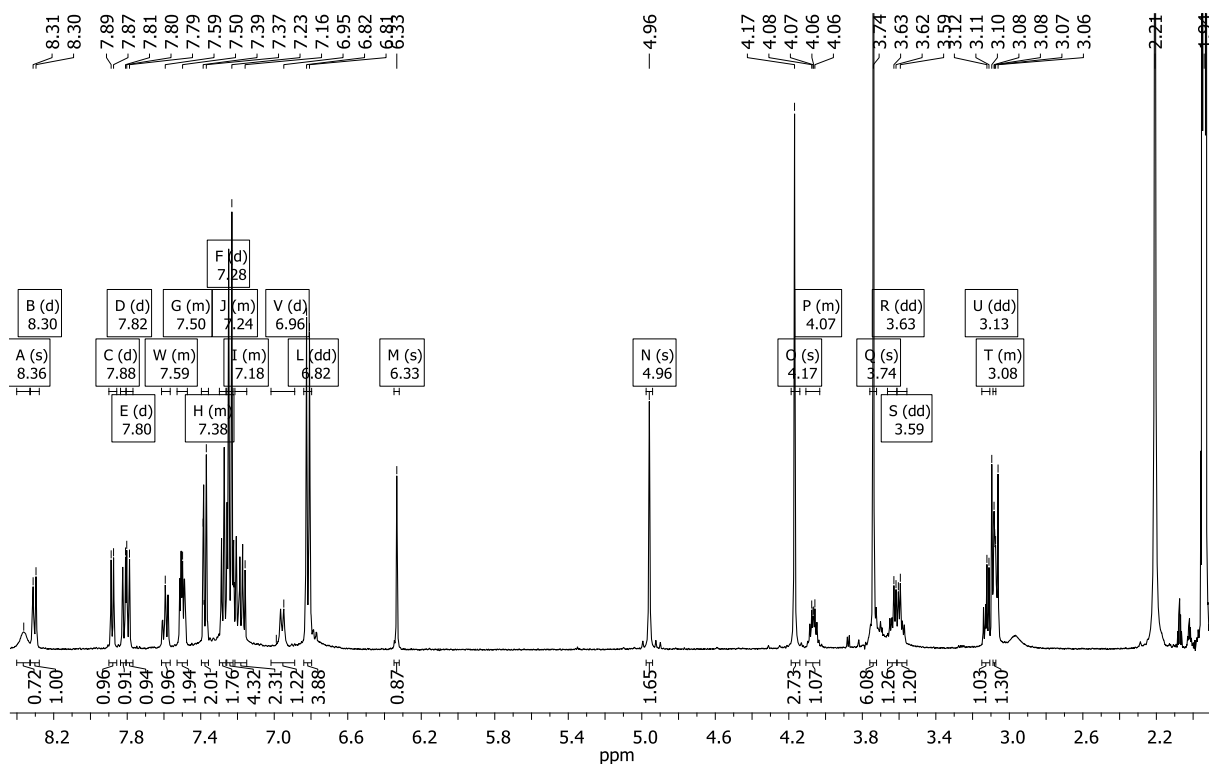
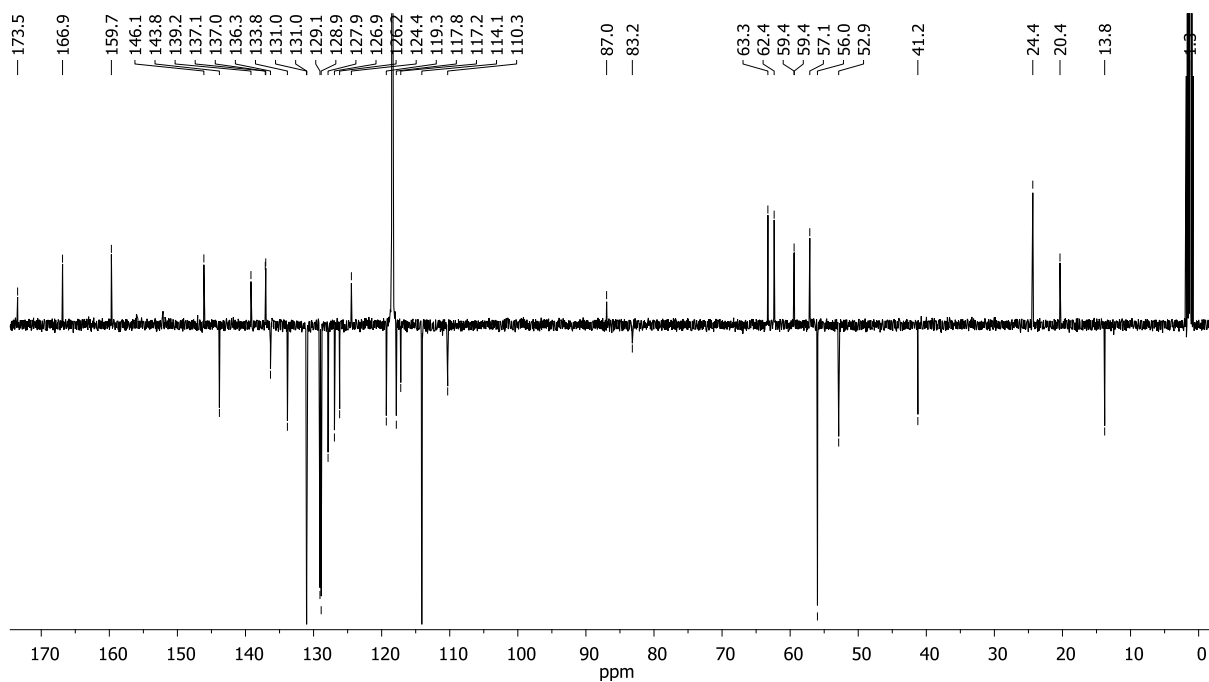
 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Glycerol-6HQ-DMTr-
Phosphoramidit (36) ^1H -NMR ^{31}P -NMR

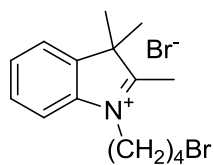
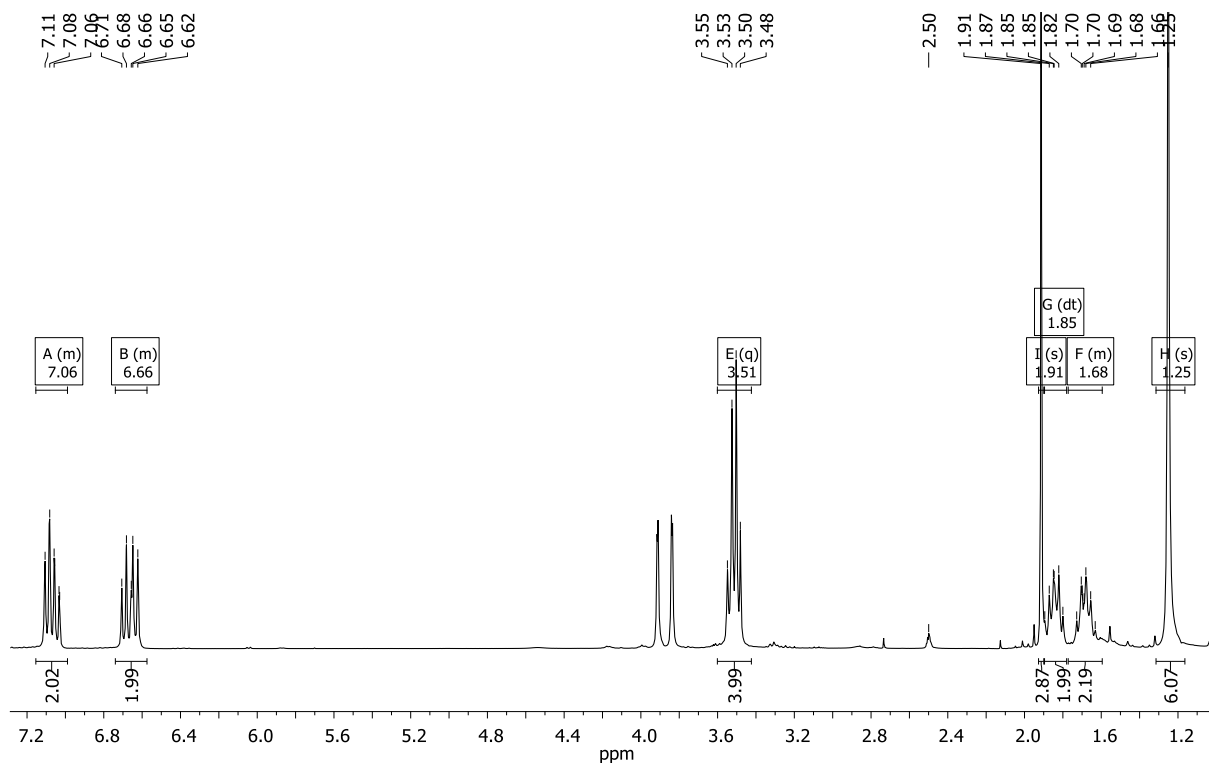
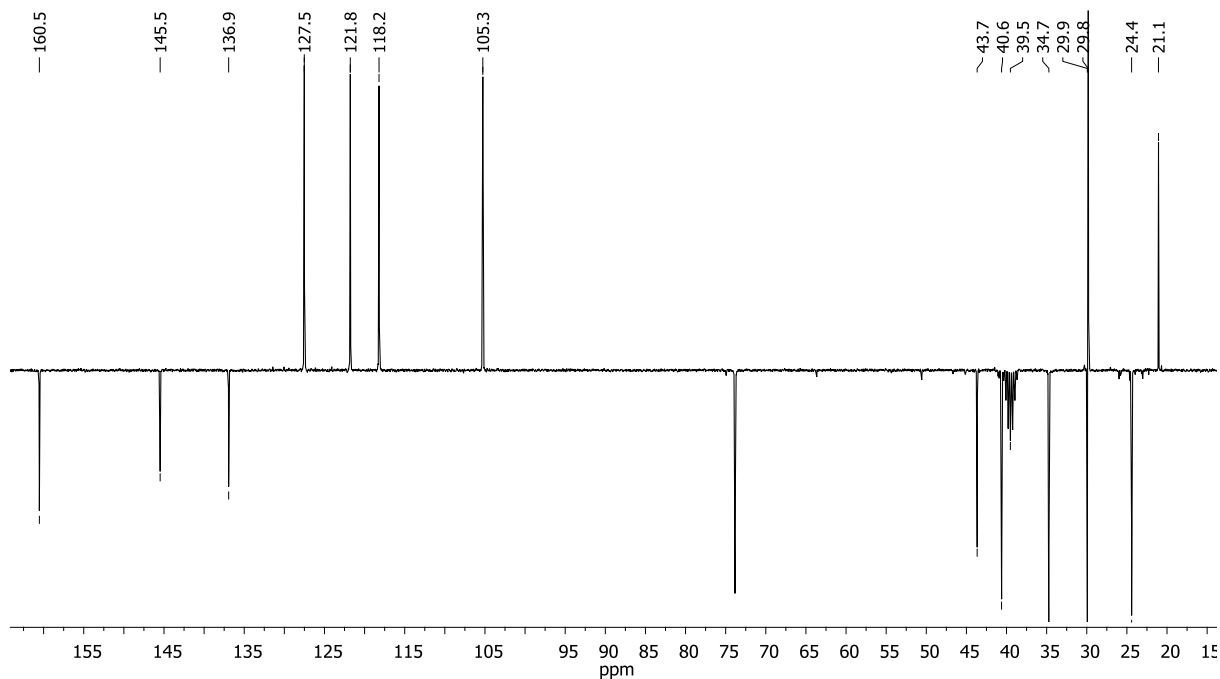
Ser(JO)DMTr-OTBS (41)

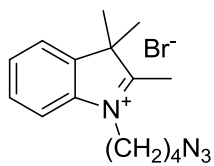
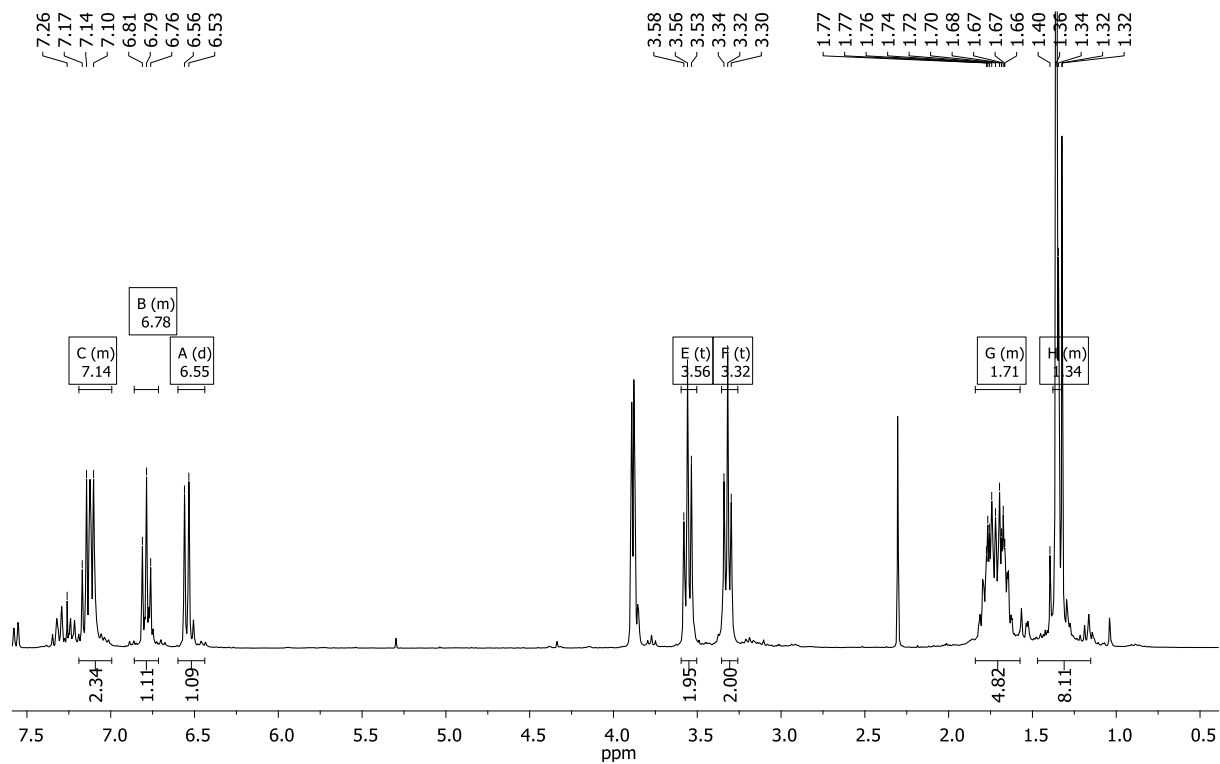
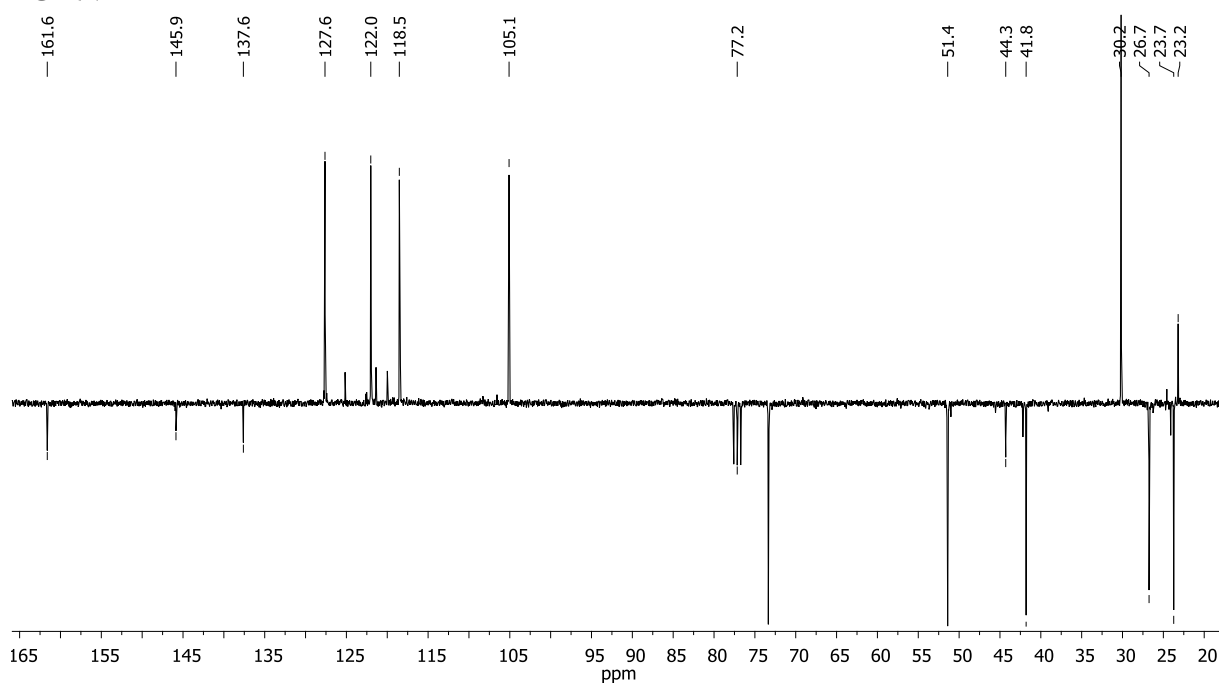
 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Ser(JO)DMTr-OH (42)

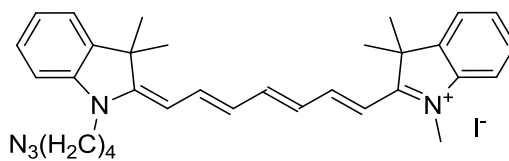
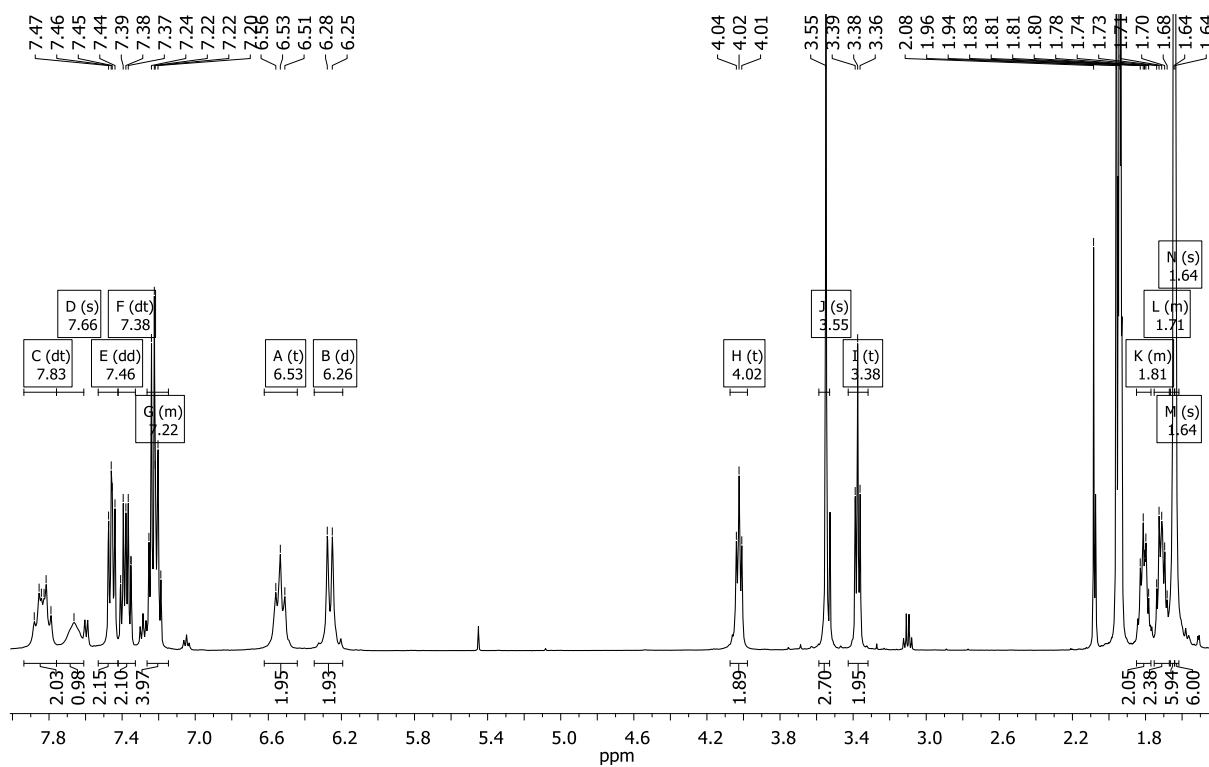
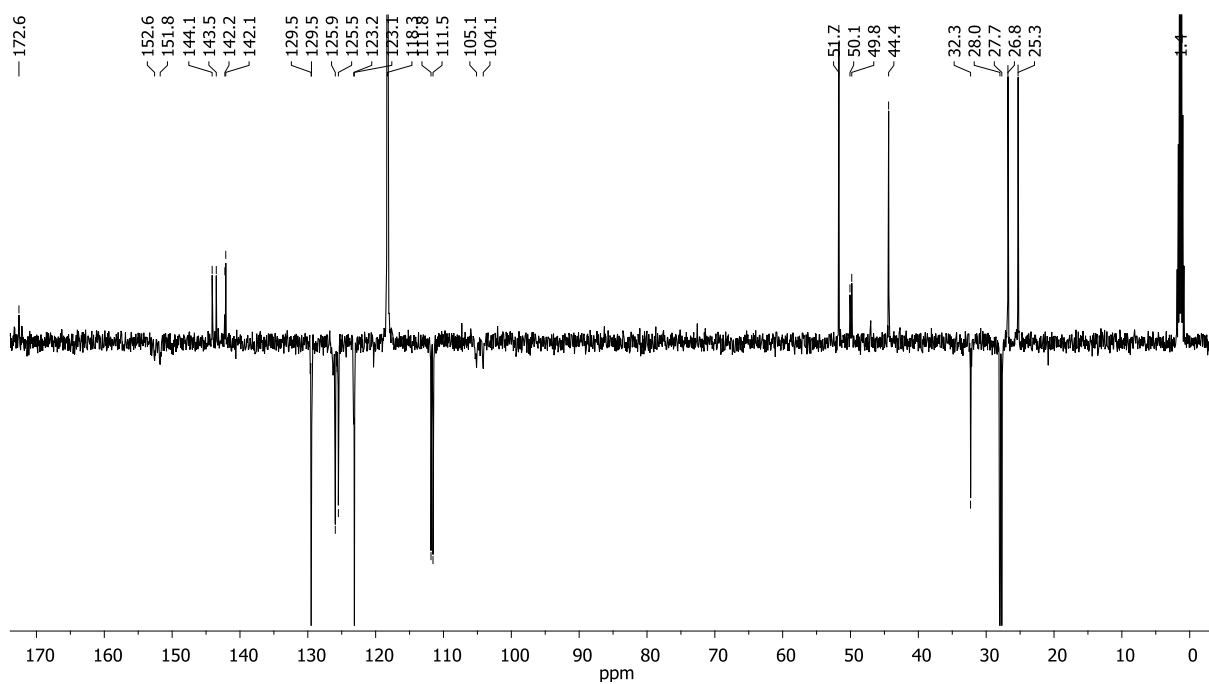
 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Bromoalkylindoliumbromid (45)

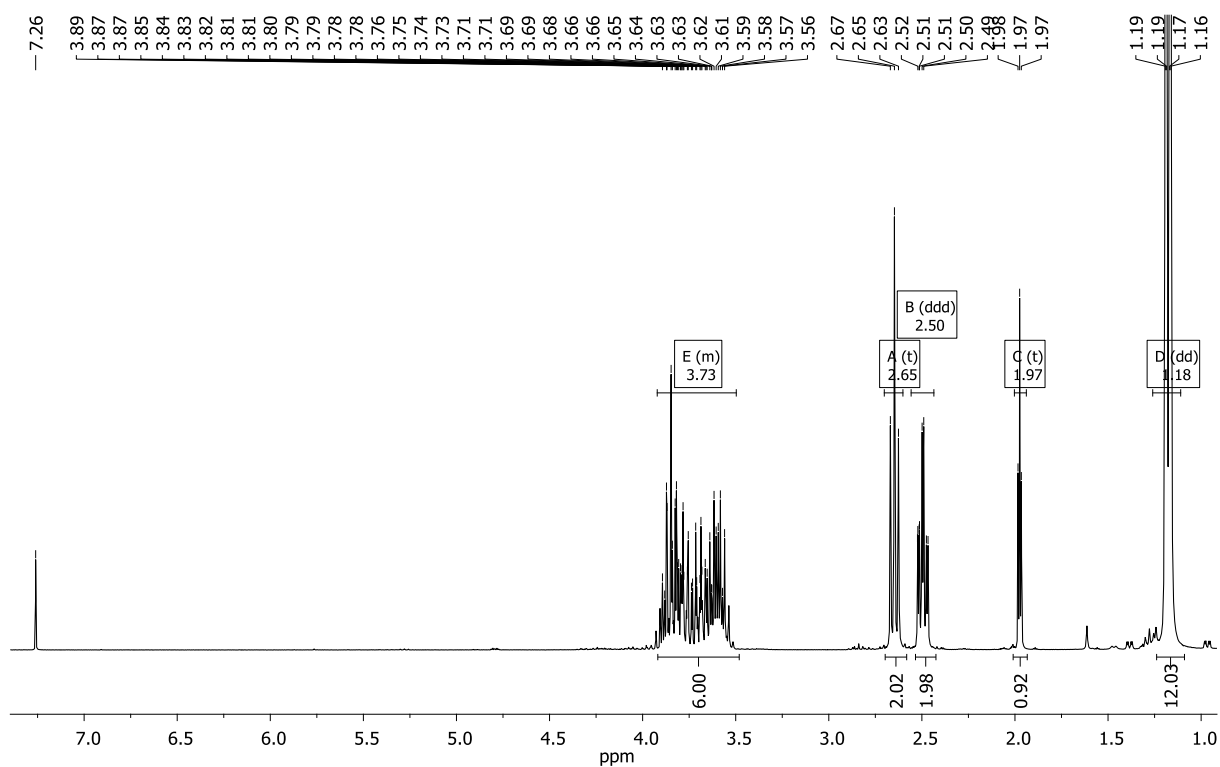
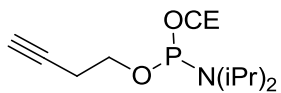
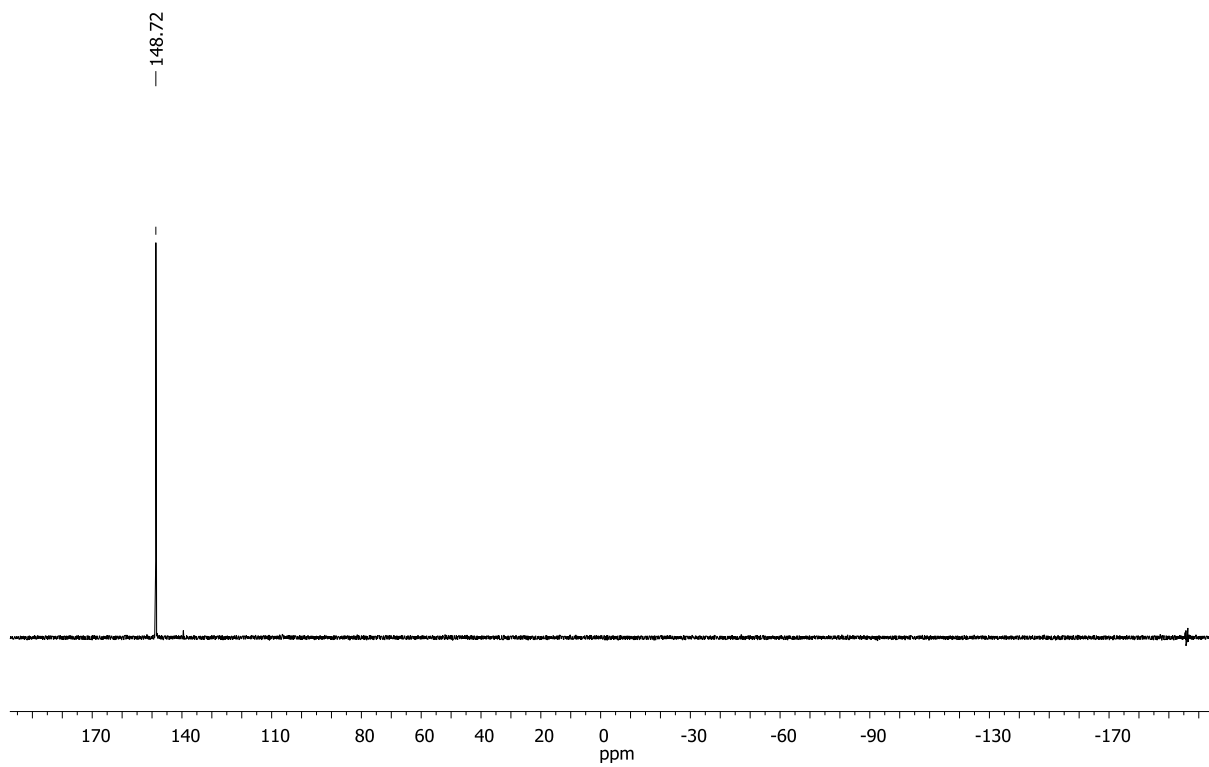
 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

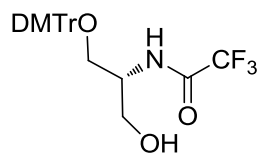
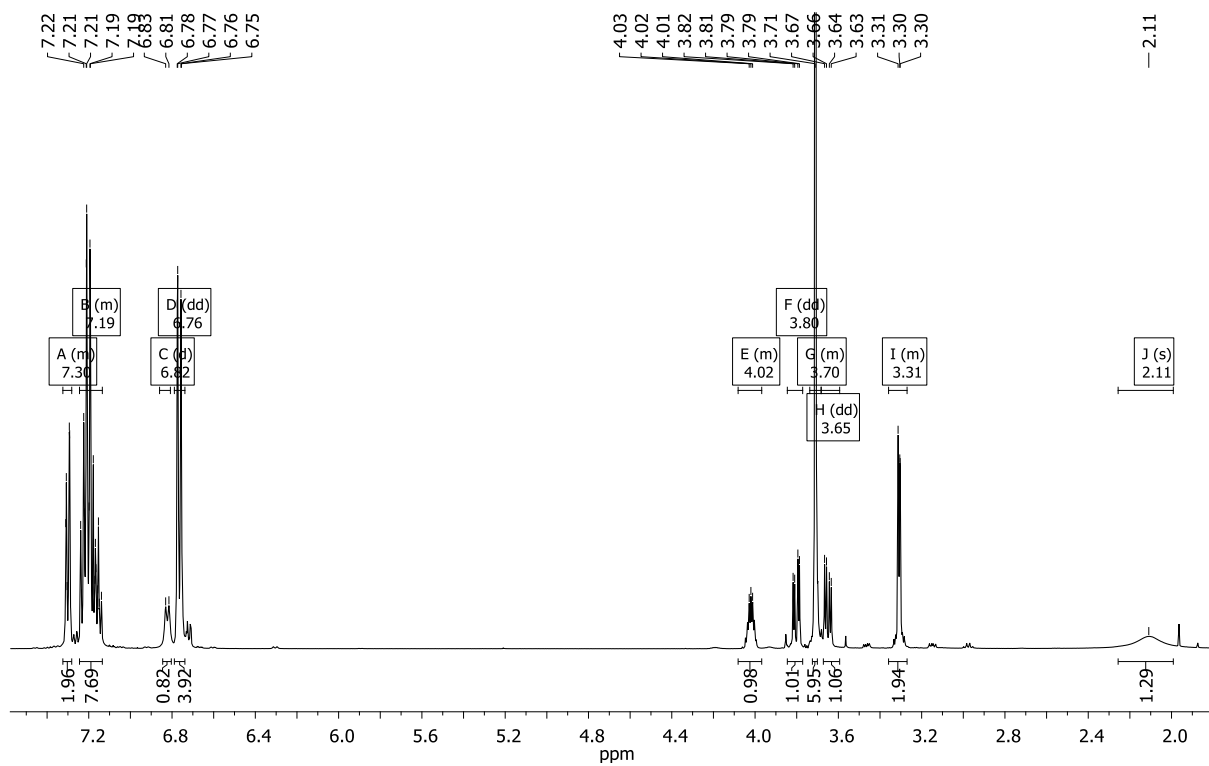
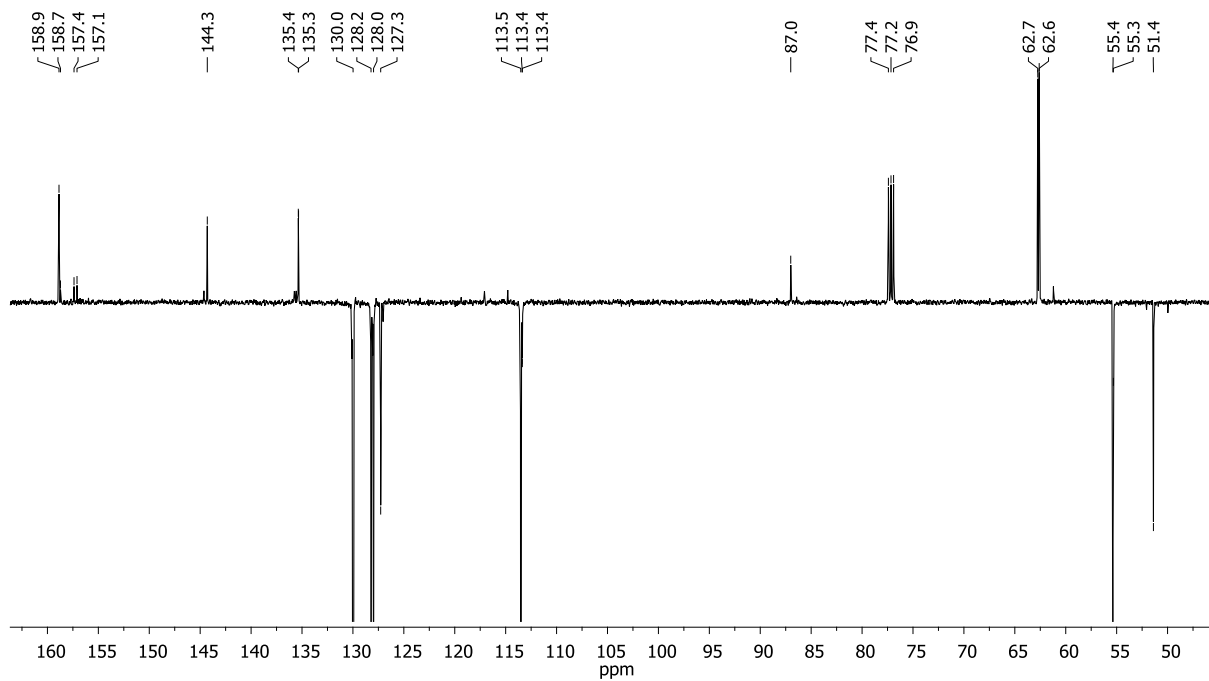
Azidoalkylindoliumbromid (**46**) $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Cy7-Azid (50)

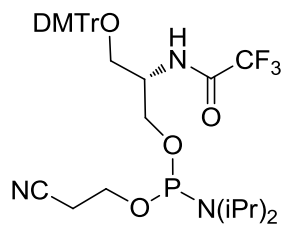
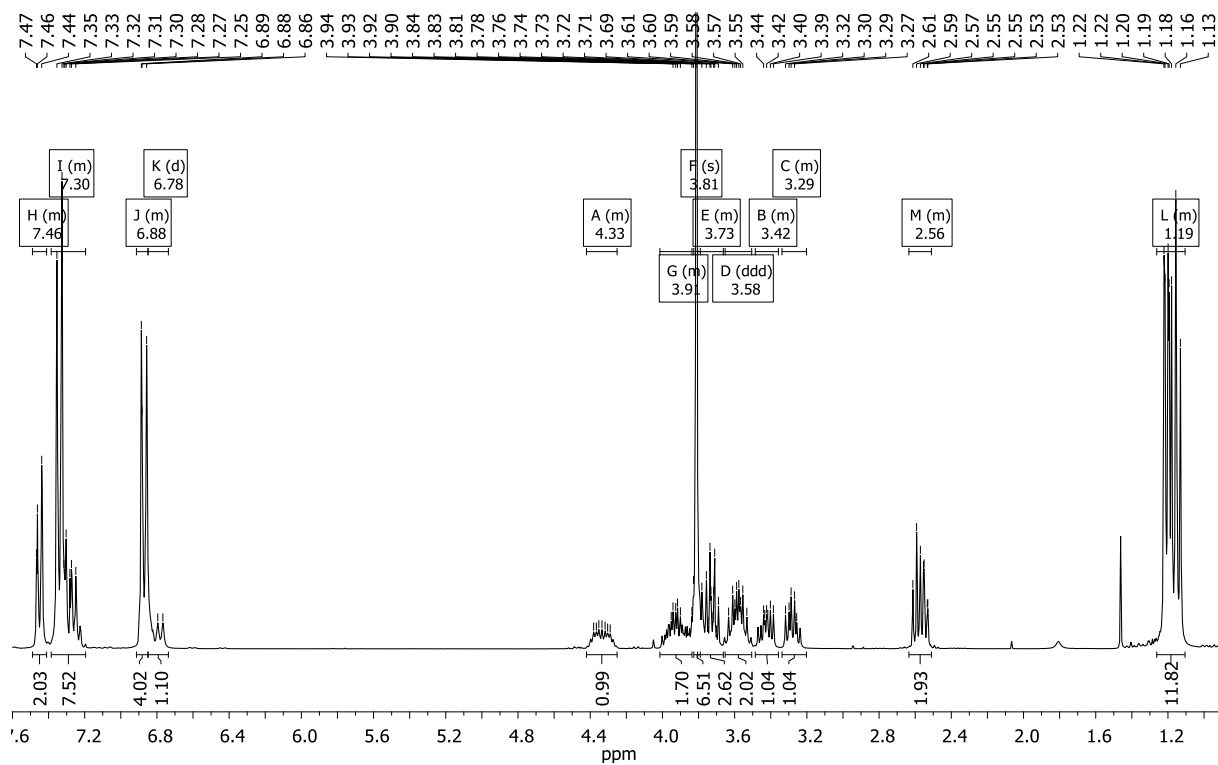
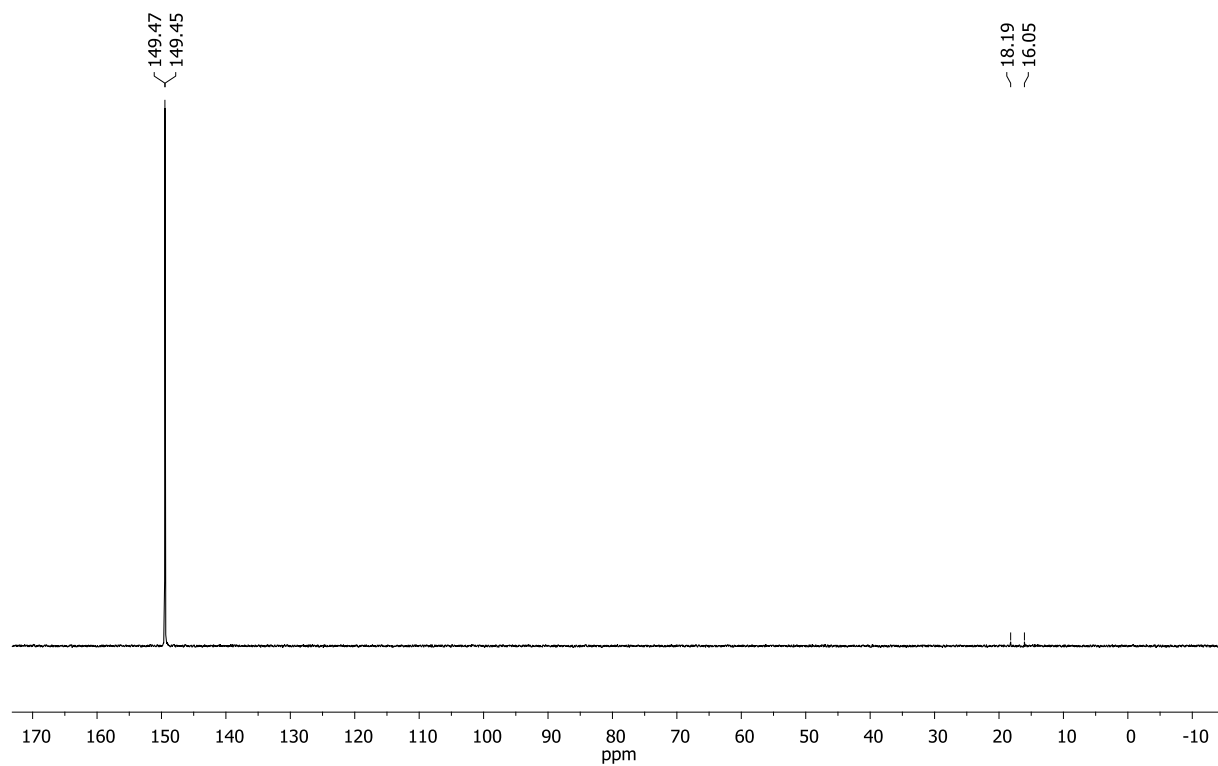
 ^1H -NMR ^{13}C -NMR

Butin-1-ol Phosphoramidit (51)

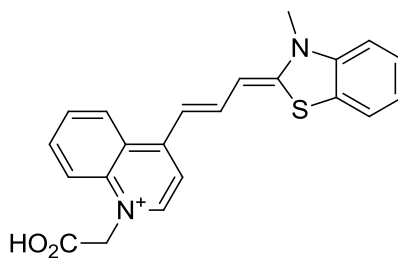
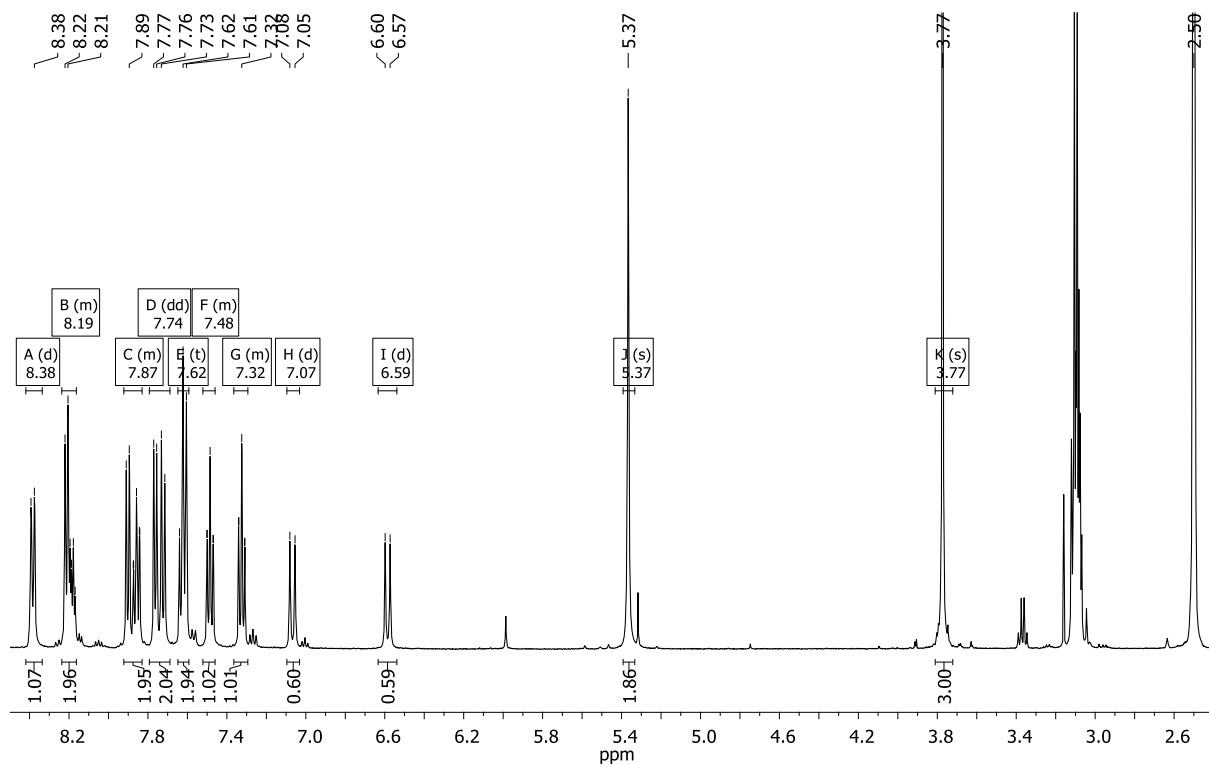
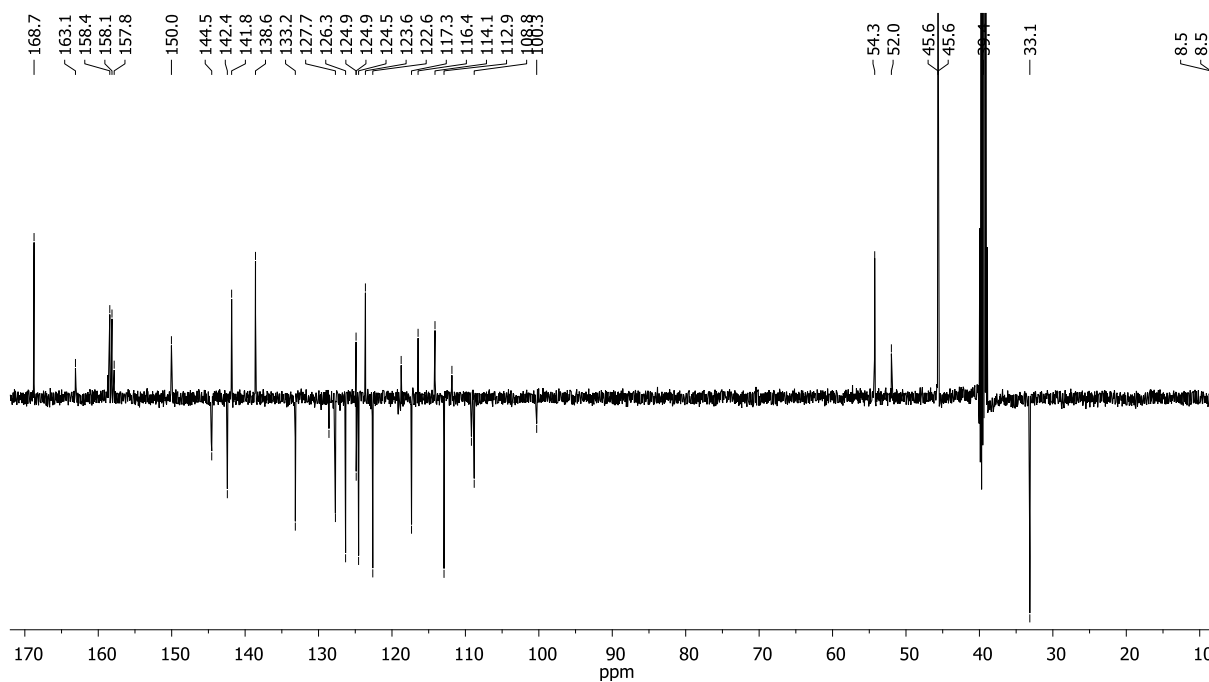
 ^1H -NMR ^{31}P -NMR

Ser(TFA)-DMTr-OH (**66**) $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

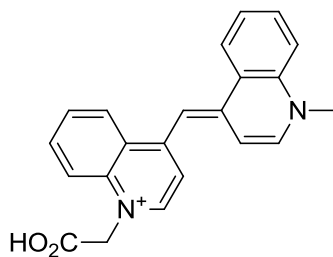
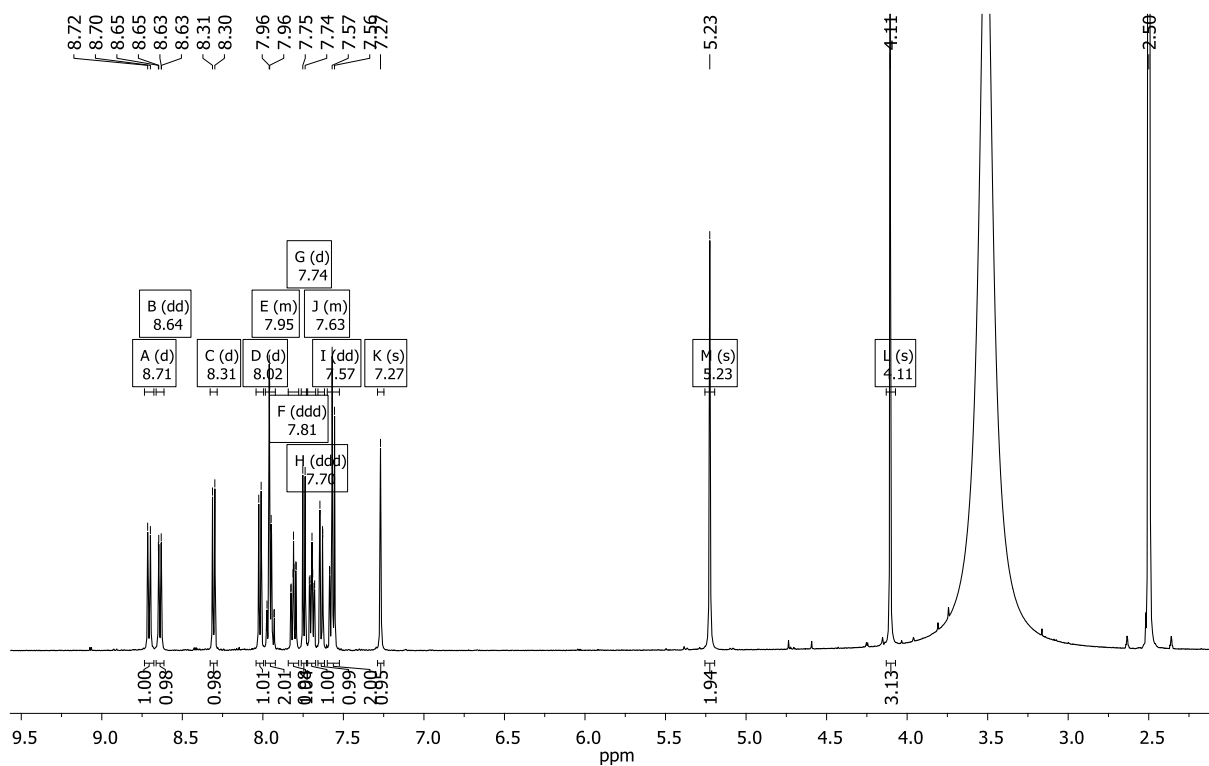
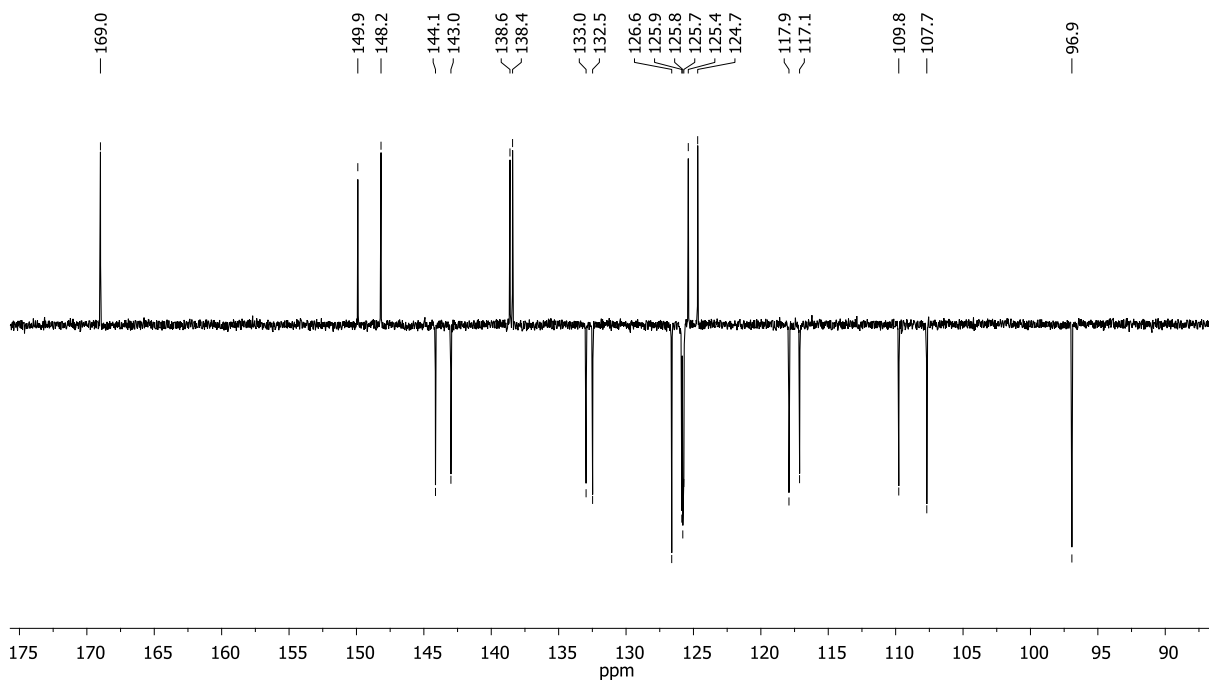
Ser(TFA)-Phosphoramidit (67)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{31}\text{P-NMR}$ 

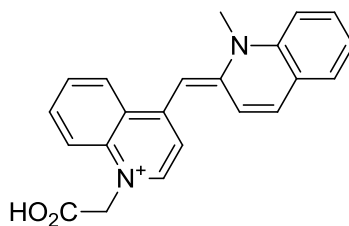
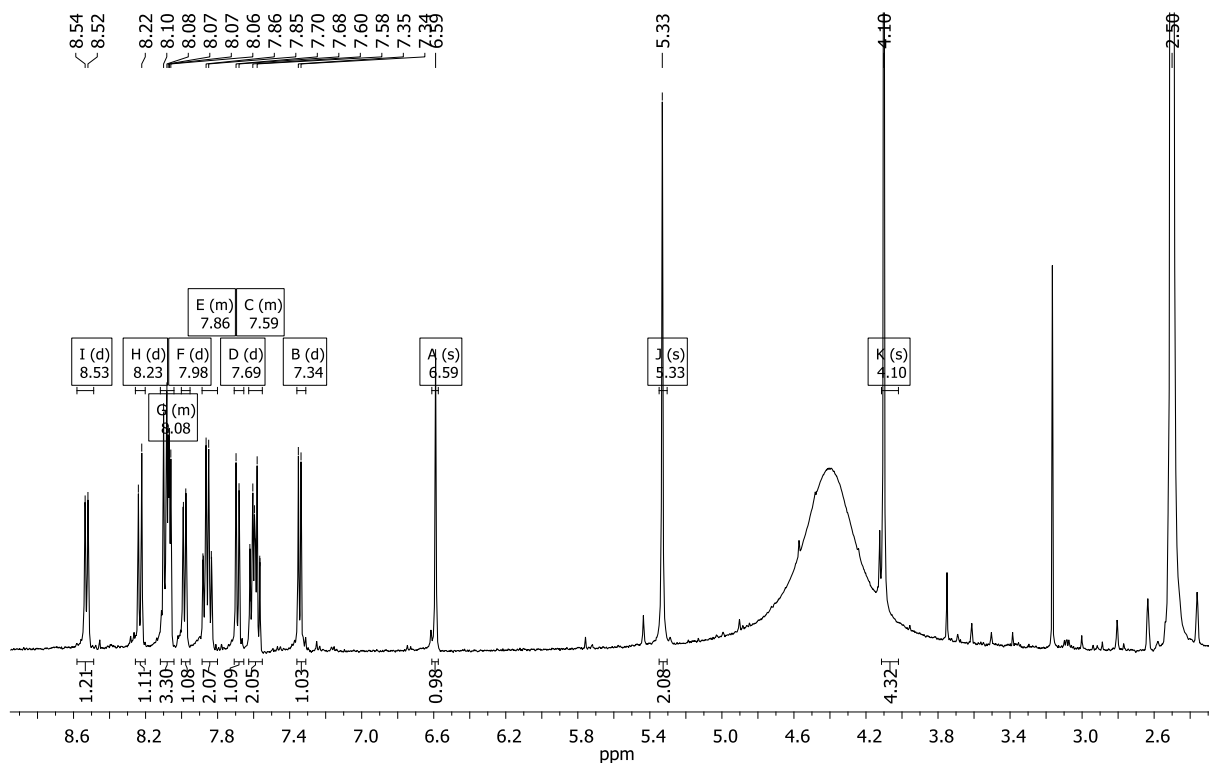
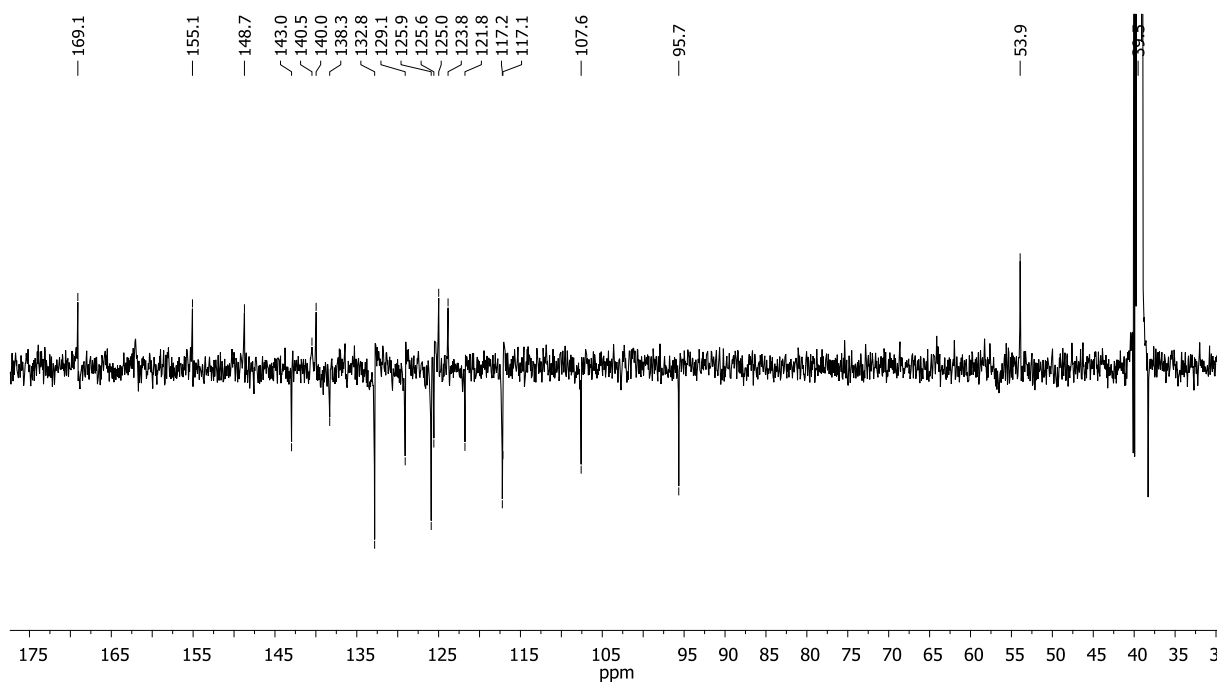
Thiazolrot (59)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

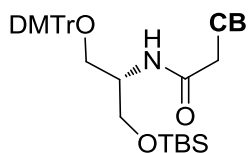
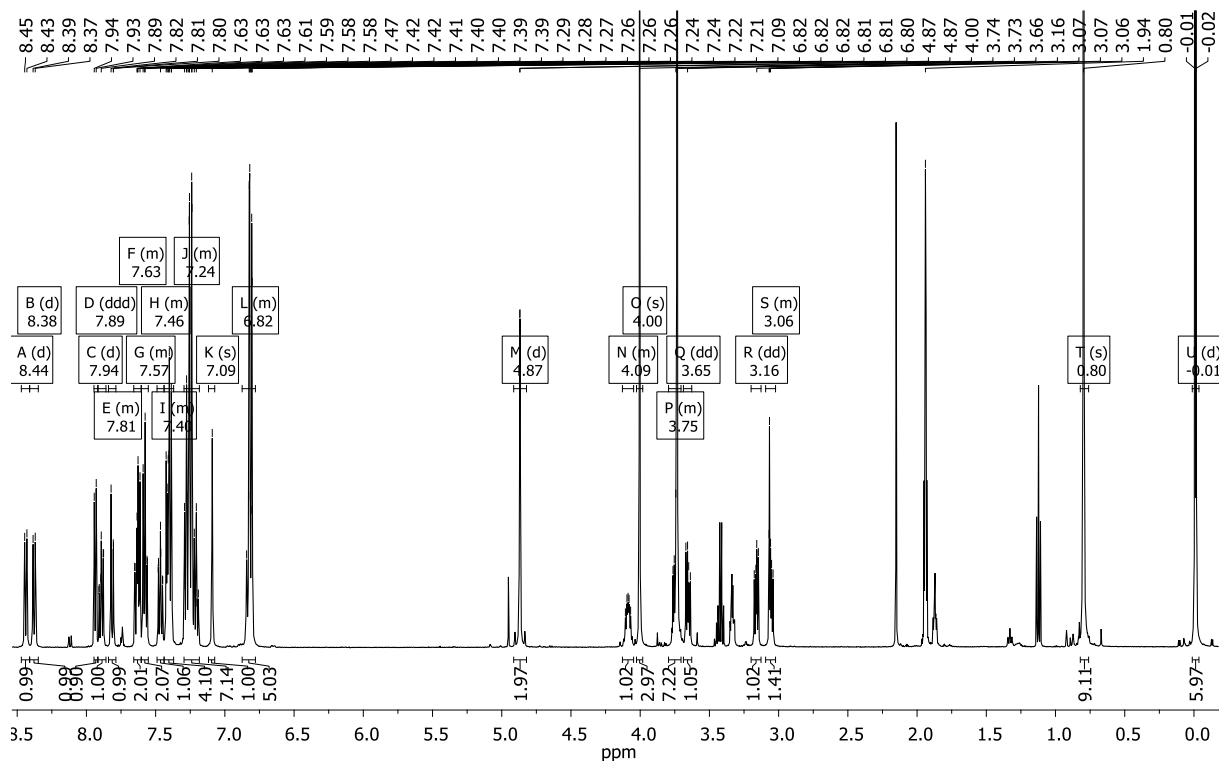
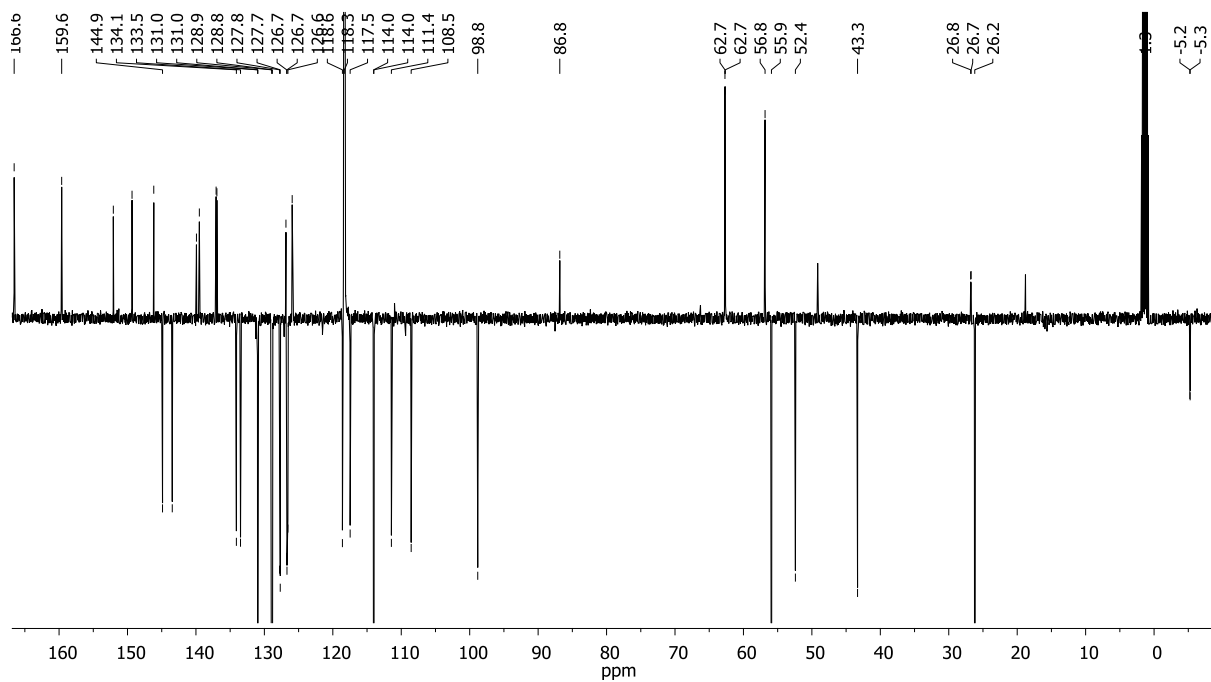
Chinolinblau (58)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

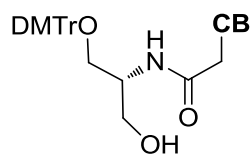
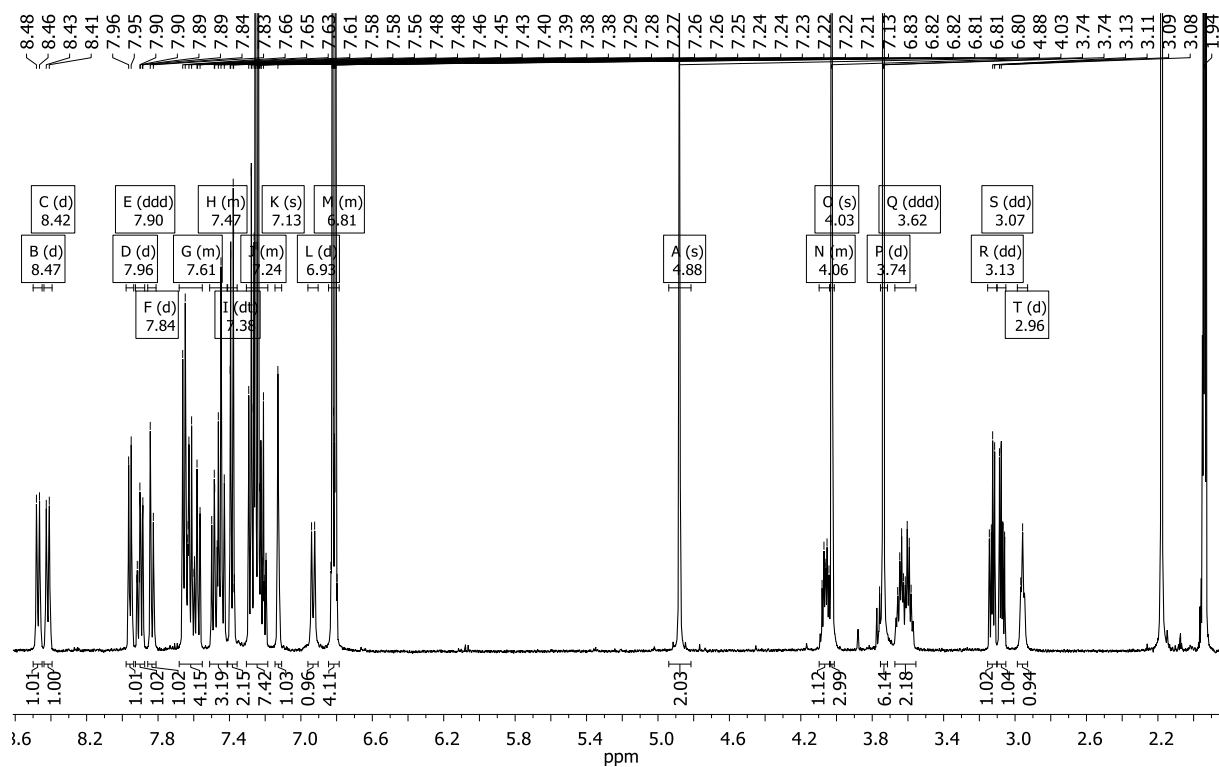
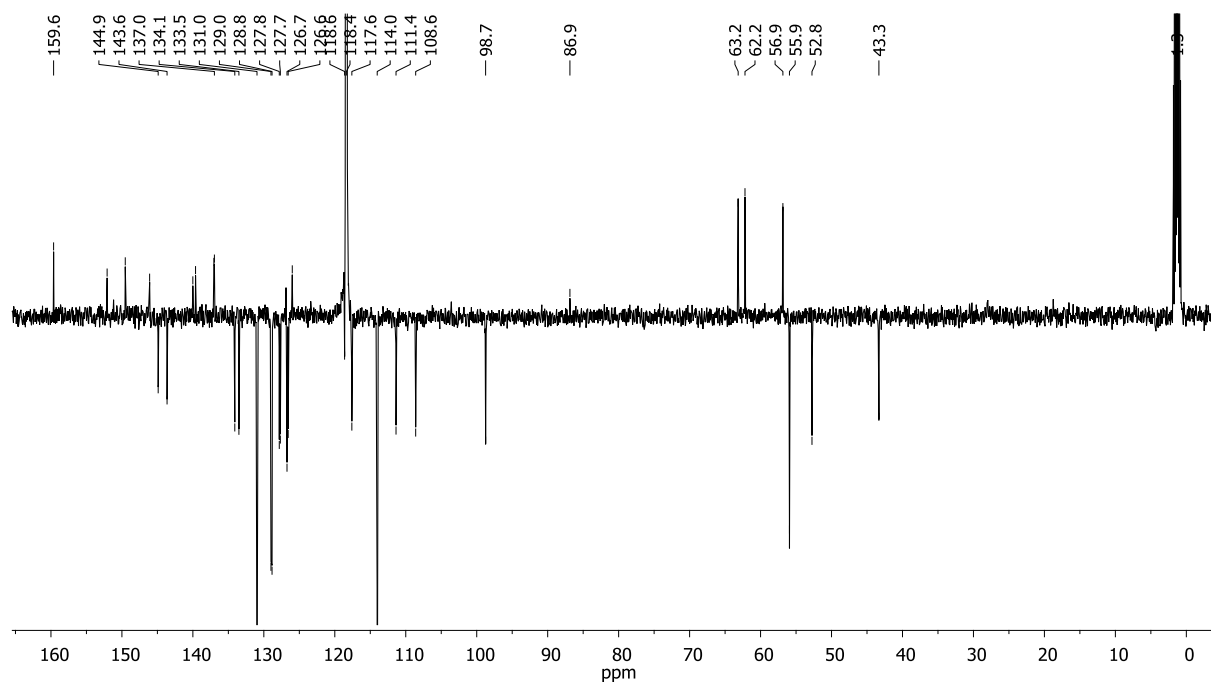
Chinolinviolett (57)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Ser(CB)-DMTr-OTBS (72)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Ser(CB)-DMTr-OH (73)

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Seitz für das spannende Promotionsthema sowie die Unterstützung, die Diskussionen aber auch die Freiheiten während meiner Promotionszeit bedanken. Durch die Möglichkeiten zur Präsentation meiner Arbeiten auf Konferenzen und in anderen Arbeitsgruppen, konnte ich über das Projekt hinaus sehr viele positive Erfahrungen mitnehmen.

Dem Verband der Chemischen Industrie danke ich für ein dreijähriges Stipendium, welches ebenfalls zahlreiche Konferenzbesuche im In- und Ausland ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Simon Loibl und Ulrike Reinhardt für die Erstkorrektur dieser Arbeit und die hilfreichen Ratschläge. Der gesamten Arbeitsgruppe Seitz möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit in Berlin und die gute Zusammenarbeit danken. Lucas Bethge möchte ich darüber hinaus für die tolle Einarbeitung in das Projekt und die bis heute andauernde Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Dr. Alexander Löwer und seinen Mitarbeitern möchte ich mich ganz herzlich für Unterstützung beim F-Tag-Projekt bedanken sowie für die Möglichkeit am MDC zu arbeiten, um biochemische Arbeitstechniken zu erlernen. Für die interessante Kooperation im Rahmen des 6HC-Projekt gilt mein Dank Prof. Dr. Nikolaus Ernsting und Lars Dehmel. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Anne Ephrussi und Dr. Imre Gaspar für die überaus produktive Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen bedanken. Durch diese Kooperation wurde es möglich im Rahmen der Arbeit solche großen Fortschritte mit den FIT-Sonden zu erzielen.

Ebenfalls möchte ich allen meinen Bachelor-, Master-, Diplom- und Forschungsstudenten (Jeanette Posern, Marc Kasper, Jonas Steffen, Manuel Wilke, Carsten Waschat, Jens Schöne, Lena Ruhe) sowie die halbjährige Zusammenarbeit mit Simone Krauss im Rahmen ihrer Ausbildung für die schöne Zusammenarbeit danken – ich hoffe ihr konntet bei mir etwas lernen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dhana Friedrich, Gerbrand van der Heyden van North, Maria Meißler und Marc Kasper für die tolle Zeit in- und außerhalb des Labors bedanken – ohne euch hätte es nicht halb so viel Spaß gemacht. Bei meiner Familie und meinen Freunden außerhalb der Wissenschaft möchte ich mich für den starken Rückhalt und die ständige Unterstützung bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Felix Hövelmann, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

Unterschrift